



Rita Alexandra de Jesus Marques Dias

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

Contribuição para o estudo da remoção biológica simultânea do 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol em sistemas de discos biológicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Coorientador: Professor Doutor João Paulo da Costa de Noronha, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente e Arguente: Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Vogais: Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;
Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;
Doutora Maria Isabel Araújo Pinto, Investigadora na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Março 2017



Rita Alexandra de Jesus Marques Dias

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

Contribuição para o estudo da remoção biológica simultânea do 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol em sistemas de discos biológicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues
Rosa, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Coorientador: Professor Doutor João Paulo da Costa de
Noronha, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente e Arguente: Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano, Professor
Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa.

Vogais: Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral, Professora
Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa;

Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora Auxiliar da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa;

Doutora Maria Isabel Araújo Pinto, Investigadora na
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa.



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2017

Contribuição para o estudo da remoção biológica simultânea do 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol em sistemas de discos biológicos.

© Copyright em nome de Rita Alexandra de Jesus Marques Dias da FCT/UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Expresso os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Professora Doutora Rita Maurício, por me ter proposto este tema e por toda a ajuda, pela disponibilidade, pelas orientações e discussões científicas e pela simpatia demonstrada ao longo deste processo, muito obrigada.

Ao meu Coorientador, Professor Doutor João Paulo Noronha e à Doutora Maria Isabel Pinto por toda o acompanhamento e ajuda nos processos laboratoriais e no esclarecimento de diversos conceitos associados à fase experimental. Sem esta preciosa ajuda, seria muito difícil concluir este estudo.

À Professora Doutora Leonor Amaral, pela ajuda, disponibilidade e simpatia que demonstrou, não só na elaboração deste trabalho, bem como ao longo do meu percurso académico.

À VALORMED, cujo suporte financeiro permitiu avançar mais um passo nesta investigação científica.

À D. Luísa e D. Adélia por toda a ajuda e apoio prestado no laboratório. À Doutora Helena Muelle pelos ensinamentos transmitidos e ajuda no manuseamento de equipamentos do laboratório.

À Dr. Maria do Rosário Duarte, pela a ajuda prestada na aprendizagem do *software Mendeley*.

Aos amigos que fiz na FCT, que fizeram do meu percurso académico “os melhores anos da minha vida”.

Aos amigos fora da faculdade, cuja amizade fez o meu dia-a-dia mais sorridente.

Ao Samuel, pelo amor, pela amizade, pelo carinho, companheirismo e apoio incondicional que demonstrou ao longo destes anos de faculdade que partilhámos.

Finalmente, aos meus pais, por todos os esforços que fizeram para me proporcionarem bem-estar, pelo processo de educação e transmissão de valores que permitiram que eu concluísse mais uma etapa da minha vida.

RESUMO

A presente dissertação aborda a problemática do aparecimento de poluentes emergentes, nomeadamente os compostos 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2), na água residual e os seus principais impactes no ambiente.

O principal objetivo foi a avaliação da eficiência de remoção destes compostos em sistemas de discos biológicos (*RBC*) operada em regime fluxo contínuo, alimentada com uma solução sintética que simulou um efluente secundário tratado de ETAR, isto é, com uma CQO de 125 mg O₂/L e com um *spiking* diário do E2 e EE2 de 100 μ g/L.

Para a deteção e quantificação dos compostos E2 e EE2 utilizou-se o método de extração *SBSE* e o método de analítico e de deteção *HPLC-DAD*. Fizeram-se dois ensaios nas mesmas condições experimentais onde se obtiveram as seguintes eficiências de remoção: i) Ensaio 1, para os compostos E2 e EE2, respetivamente 64% e 23%; ii) Ensaio 2, para os compostos E2 e EE2, respetivamente 63% e 18%.

Adicionalmente realizaram-se outros ensaios, nomeadamente: i) elaboração de uma curva de calibração numa matriz de Metanol com recurso a *SBSE* para comparar com a curva de calibração numa matriz de água desmineralizada, concluindo que o desempenho do método *SBSE* é favorecido na matriz em água; ii) elaboração de um teste (sem recurso a *SBSE*) de fotodegradação dos compostos, onde se concluiu que estes não são fotodegradáveis; iii) elaboração de uma curva de calibração sem recurso a *SBSE* para quantificar os testes efetuados.

Palavras-chave: Compostos disruptores endócrinos, 17 β -Estradiol (E2), 17 α -Ethinilestradiol (EE2), Reatores de discos biológicos (RBC), HPLC-DAD, SBSE, Tratamento de águas residuais.

ABSTRACT

The present dissertation addresses the emergence of emergent pollutants, such as 17 β -Estradiol (E2) and 17 α -Ethinylestradiol (EE2), in wastewater and its main impacts on the environment.

The main objective was to evaluate the efficiency of removal of these compounds through rotating biological contactors (RBC) operated in a continuous flow regime, fed with a synthetic solution that simulated a secondary effluent treated of ETAR, that is, with a COD of 125 mg O₂ / L and with a daily spiking of E2 and EE2 of 100 μ g / L.

For the detection and quantification of compounds E2 and EE2, the SBSE extraction method and the HPLC-DAD analytical and detection method were used. Two tests were carried out under the same experimental conditions where the following removal efficiencies were obtained: i) Test 1, for compounds E2 and EE2, respectively 64% and 23%; li) Test 2, for compounds E2 and EE2, respectively 63% and 18%.

Additionally, other tests were carried out, namely: i) elaboration of a calibration curve in a methanol matrix using SBSE to compare with the calibration curve in a demineralized water matrix, concluding that the performance of the SBSE method is favored in the matrix in Water; ii) elaboration of a photodegradation test (without SBSE), where it was concluded that these are not photodegradable; iii) preparation of a calibration curve without SBSE to quantify the tests performed.

Key-words: EDC, 17 β -Estradiol (E2), 17 α -Ethinylestradiol (EE2), Rotating Biological Contactors (RBC), HPLC-DAD, SBSE, Wastewater Treatment.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de Amônio
AOPs	Processos Avançados de Oxidação
$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	17 β -Estradiol
$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	17 α -Etinilestradiol
$\text{C}_6\text{H}_5\text{FO}$	2-Fluorofenol
$\text{C}_9\text{H}_7\text{FO}_2$	4-Fluorocinâmico
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cálcio dihidratado
CDE	Compostos Disruptores Endócrinos
CH_3CN	Acetonitrilo
$\text{CH}_3\text{OH} / \text{MeOH}$	Metanol
CQO	Carência Química de Oxigênio
DLLE	Extração Líquido-Líquido Dispersiva
$\text{DMSO} / \text{CH}_3\text{SOCH}_3$	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQA	Diretiva Quadro da Água
E2	17 β -Estradiol
EE2	17 α -Etinilestradiol
EPS	Substância Polimérica Extracelular
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residual
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Ferro (III) hexahidratado
GC	Cromatografia Gasosa
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
HCOOH	Ácido Fórmico
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta Performance com Detetor de Fotodíodos
K_a	Constante de dissociação de um ácido
KH_2PO_4	Dihidrogenofosfato de potássio
K_{ow}	Coeficiente de partilha octanol/água
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MCR-ALS	Resolução Multivariada de Curvas de Mínimos Quadrados Alternantes

MgSO ₄ .7 H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptahidratado
MLLE	Micro-Extração Líquido-Líquido
MnSO ₄ . 5 H ₂ O	Sulfato de Manganês pentahidratado
MS	Detector de Massa
NaCl	Cloreto de Sódio
n.d.	Não detetável
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
PDMS	Polidimetilsiloxano
pK _a	cologaritmo da constante de dissociação de um ácido
ppb	partes por bilhão
PVC	Policloreto de Vinilo
QS	Quorum sensing
rpm	rotações por minuto
SBSE	Extração Sortiva em Barra de Agitação
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Micro-Extração em Fase Sólida
SSNV	Sólidos Suspensos Não Voláteis
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
VTG	Vitelogenina

Índice

1.	Introdução	1
2.	Objetivos.....	3
3.	Estrutura da dissertação	5
4.	Enquadramento.....	7
4.1.	Disrupção endócrina e sua atuação no sistema endócrino.....	7
4.2.	Grupos de Substâncias disruptoras endócrinas.....	7
4.3.	Enquadramento Legal	8
4.4.	Fontes de contaminação	10
4.5.	Propriedades físico-químicas dos fármacos	12
4.6.	Implicações no ambiente e na saúde pública	15
4.7.	Remoção dos fármacos em ETAR	17
4.8.	Reatores de Discos Biológicos e sua aplicabilidade	22
4.9.	Biofilme	23
4.10.	Métodos e técnicas de quantificação de compostos disruptores endócrinos.....	25
5.	Plano Experimental	31
6.	Materiais e Métodos	33
6.1.	Instalação Piloto.....	33
6.2.	Material utilizado	35
6.3.	Biofilme	36
6.4.	Método laboratorial adotado.....	39
6.5.	Parâmetros de Controlo	42
6.5.1.	Determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO).....	42
6.5.2.	Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Suspensos não Voláteis (SSNV)	43
6.5.3.	pH	44
6.6.	Ensaio preliminares	44
6.7.	Curva de Calibração para quantificação das amostras.....	48

6.8.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação com a coluna Luna 5µm C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO)	49
6.9.	Método de quantificação dos compostos E2 e EE2	49
7.	Resultados	51
7.1.	Parâmetros de controlo	51
7.2.	Remoção dos compostos E2 e EE2 através de um piloto de discos biológicos	57
7.3.	Ensaio Preliminares	64
8.	Discussão de Resultados	71
9.	Conclusões	75
10.	Desenvolvimentos Futuros	77
11.	Bibliografia	79
Anexos	95

Índice de Anexos

Anexo I Ficha Técnica 17 β -Estradiol.....	97
Anexo II Ficha Técnica 17 α -Ethinilestradiol.....	98
Anexo III Tabelas Referência	99
Anexo IV Cromatogramas do 1º Ensaio	101
Anexo V Cromatogramas do 2º Ensaio	103

Índice de Figuras

Figura 4.1. Estrutura química do composto 17 β -Estradiol.....	12
Figura 4.2. Estrutura química do composto 17 α -Ethinilestradiol.....	13
Figura 4.3 Cinco estágios de desenvolvimento do biofilme.....	24
Figura 4.4 Representação esquemática da SBSE.	27
Figura 4.5 HPLC e detetor de fotodíodos.....	29
Figura 5.1 Cronograma dos ensaios.	32
Figura 6.1 Diagrama da instalação piloto	34
Figura 6.2 Instalação Piloto.....	34
Figura 6.3 Esquema dos procedimentos para a preparação da alimentação diária.. ..	37
Figura 6.4 Solução de alimentação.....	38
Figura 6.5 Procedimento experimental para a preparação do ensaio de fotodegradação.	45
Figura 6.6 Esquema da preparação das amostras para teste.	46
Figura 6.7 Procedimento experimental para o teste de filtração direto.....	47
Figura 6.8 Procedimento experimental para preparação da curva de calibração em matriz alcoólica.....	47
Figura 6.9 Esquema do procedimento experimental para a preparação dos padrões diretos dos compostos E2 e EE2.....	48
Figura 6.10 Exemplificação da preparação do padrão 25 μ g/L.	48
Figura 7.1 Fase de crescimento de biofilme do Ensaio 1.....	52
Figura 7.2 Eficiência de remoção da CQO na fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 1.	53
Figura 7.3 Fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 1.....	53
Figura 7.4 Fase de crescimento do biofilme do Ensaio 2.....	55
Figura 7.5 Eficiência de remoção da CQO na fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 2.	56
Figura 7.6 Fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 2.....	56

Figura 7.7 Curva de calibração adotada para a quantificação da concentração removida de E2 em ambos os ensaios.....	58
Figura 7.8 Curva de calibração adotada para a quantificação da concentração removida de EE2 em ambos os ensaios.	58
Figura 7.9 Cromatograma da amostra de 25 µg/L.....	59
Figura 7.10 Cromatograma da amostra de 200 µg/L.....	59
Figura 7.11 Espectros de absorção dos compostos E2 e EE2, (λ = 215-320 nm).	60
Figura 7.12 Eficiência de remoção do composto E2 no ensaio 1.	61
Figura 7.13 Eficiência de remoção do composto EE2 no ensaio 1.....	62
Figura 7.14 Eficiência de remoção do composto E2 no ensaio 2.	63
Figura 7.15 Eficiência de remoção do composto EE2 no ensaio 2.....	64
Figura 7.16 Curva de calibração dos compostos E2 e EE2 em metanol com recurso a SBSE.	65
Figura 7.17 Comparação entre a curva de calibração numa amostra em água desmineralizada e a curva de calibração numa amostra em metanol para o composto 17 β -Estradiol.	65
Figura 7.18 Comparação entre a curva de calibração numa amostra em água desmineralizada e a curva de calibração numa amostra em metanol para o composto 17 α -Ethinilestradiol.	66
Figura 7.19 Curvas de calibração sem recurso a SBSE para os compostos E2 e EE2.	66
Figura 7.20 Cromatograma da amostra de 200 µg/L sem o recurso a SBSE.....	67
Figura 7.21 Cromatograma da amostra de 2000 µg/L sem o recurso a SBSE.....	67
Figura 7.22 Espectro de absorção dos compostos E2 e EE2, (λ = 215-320 nm).	67
Figura 7.23 Resultados obtidos no teste de fotodegradação do composto E2 ao longo de 5 dias.....	68
Figura 7.24 Resultados obtidos no teste de fotodegradação do composto EE2 ao longo de 5 dias.....	69

Índice de Tabelas

Tabela 4.1. Propriedades físico-químicas do composto 17 β -Estradiol.	13
Tabela 4.2. Propriedades físico-químicas do composto 17 α -Etinilestradiol.	14
Tabela 4.3. Tipos de tratamento biológico para a remoção dos compostos E2 e EE2.	19
Tabela 4.4 Tipos de tratamento terciário para a remoção dos compostos E2 e EE2. .	21
Tabela 4.5 Exemplo de compostos orgânicos e inorgânicos removidos através de discos biológico.	23
Tabela 5.1 Resumo do procedimento experimental.	31
Tabela 5.2 Plano experimental detalhado.	32
Tabela 6.1 Dimensões e características de operação de toda a instalação piloto.	33
Tabela 6.2 Composição do efluente doméstico simulado.	37
Tabela 6.3 Contribuição de cada composto para a CQO.	39
Tabela 6.4 Cálculos para estimar a contribuição em CQO da toma diária da solução mista dos compostos E2 e EE2.	39
Tabela 7.1 Valores de CQO na fase de crescimento do biofilme do Ensaio 1.	51
Tabela 7.2 Valores de CQO para controlo durante a remoção dos compostos E2 e EE2.	52
Tabela 7.3 Valores de SST, SSV e SSNV no ensaio 1.	54
Tabela 7.4 Valores de CQO da solução de alimentação na fase de crescimento do biofilme do Ensaio 2.	54
Tabela 7.5 Valores de CQO para controlo durante a remoção dos compostos E2 e EE2.	55
Tabela 7.6 Valores de SST, SSV e SSNV no ensaio 2.	57
Tabela 7.7 Limites de deteção e quantificação para os compostos em estudo.	60
Tabela 7.8 Concentrações de E2 removidas diariamente no ensaio 1.	61
Tabela 7.9 Concentrações de EE2 removidas diariamente no ensaio 1.	62
Tabela 7.10 Concentrações de E2 removidas diariamente no ensaio 2.	63
Tabela 7.11 Concentrações de EE2 removidas diariamente no ensaio 2.	64
Tabela 7.12 Resultados do ensaio de fotodegradação para os compostos E2 e EE2.	68

Tabela 7.13 Resultados do ensaio de teste ao sistema de filtração para os compostos E2 e EE2.....	69
Tabela 9.1 Resumo dos resultados obtidos do estudo da eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2 utilizando um piloto de discos biológicos.....	75

1. Introdução

A existência de micropoluentes nos meios aquáticos é, atualmente, um dos aspectos mais relevante no que se refere à qualidade da água. Este tipo de poluentes, estão presentes no ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L , tendo aumentado consideravelmente nos últimos anos (Bila & Dezotti, 2007). A intensa atividade industrial e agrícola, os resíduos urbanos e as águas residuais são as principais origens de contaminação (Viladomat, 2010). Assim, o estudo do destino final destes poluentes em estações de tratamento de água residual é de extrema importância (Farré *et al.*, 2008).

Os compostos disruptores endócrinos (EDC) são uma das classes de substâncias micropoluentes muito estudadas devido, principalmente, aos seus efeitos adversos nos organismos aquáticos e na saúde humana. Em seres humanos e animais, a disrupção endócrina é um mecanismo de efeito relacionado com funcionamento do sistema endócrino (Bila & Dezotti, 2007). O sistema endócrino consiste num conjunto de glândulas que se distribuem em diversas zonas do corpo, e que produzem hormonas com diferentes funções. A disrupção endócrina ocorre quando os compostos disruptores interagem com os recetores de hormonas, alterando os padrões naturais de resposta do sistema endócrino (Birkett, 2003).

Segundo a *United States Environmental Protection Agency* (U.S. EPA), “Um disruptor endócrino é um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormonas naturais do corpo que são responsáveis pela sua homeostasia, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (Birkett, 2003).

Torna-se assim, crucial avaliar a problemática associada aos compostos disruptores endócrinos, no sentido de perceber os seus efeitos no ambiente e mais especificamente nos humanos (Bila & Dezotti, 2007), bem como a capacidade de remoção destes compostos das águas residuais.

2. Objetivos

A presente dissertação tem como objetivo, avaliar a capacidade de remoção biológica conjunta do 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol, através de sistemas de biomassa fixa a uma concentração constante de 100 μ g/L.

3. Estrutura da dissertação

A dissertação está dividida em dez capítulos e cinco anexos, cujas referências bibliográficas foram baseadas em artigos publicados e em dissertações de Mestrado e Doutorado.

O primeiro capítulo é introdutório, apresentando a problemática que serve de base para o estudo da presente dissertação. O segundo capítulo apresenta o objetivo da tese.

No quarto capítulo é apresentado todo o enquadramento teórico base para o desenvolvimento experimental da presente tese. O quinto apresenta o plano experimental adotado, bem como o cronograma da tese, o sexto capítulo são os materiais e métodos utilizados para concretização do estudo com base no método de extração *SBSE* e método analítico e detecção *HPLC-DAD*. O sétimo capítulo apresenta os resultados obtidos na presente dissertação.

Os oitavo e nono capítulos apresentam a discussão geral de resultados e as principais conclusões do presente estudo. O décimo capítulo descreve os desenvolvimentos futuros que se consideram relevantes para o avanço científico nesta matéria.

4. Enquadramento

4.1. Disrupção endócrina e sua atuação no sistema endócrino

Todos os organismos multicelulares necessitam de regular a funcionalidade e a interação das diferentes células que os constituem. Para tal, dispõem de dois sistemas distintos, o nervoso e o endócrino. O sistema endócrino é crucial tanto para animais como para plantas, uma vez que é o responsável por várias funções básicas do organismo, nomeadamente, a reprodução, o crescimento, a homeostasia, a manutenção e o metabolismo. Este sistema é composto por diversas glândulas, localizadas em diferentes áreas do corpo, que produzem hormonas com diferentes funções. As glândulas constituintes do sistema endócrino são, respetivamente, o hipotálamo, a hipófise, a tiroide, a paratiroide, as glândulas suprarrenais, gónadas e a glândula pineal (Birkett, 2003).

A síntese de hormonas permite despoletar a resposta natural do corpo, encaminhando-as para os órgãos/células alvo através da corrente sanguínea. As células alvo contêm locais recetores que permitem a anexação da hormona, produzindo uma mensagem que, por sua vez, induz a resposta desejada. As hormonas produzidas no corpo têm um período de permanência muito reduzido, devido, essencialmente, a mecanismos metabólicos de depuração. Contudo, na presença de EDC, estes mecanismos podem não ocorrer, levando à bioacumulação destes compostos no corpo (Birkett, 2003).

O mecanismo de disrupção endócrina ocorre quando os EDC interagem com o recetor hormonal na célula, modificando os padrões da resposta natural do sistema endócrino. Estes químicos podem ligar-se ao recetor, uma vez que a sua estrutura é semelhante à da hormona natural, ativando assim diferentes tipos de mecanismos (Birkett, 2003). Os disruptores endócrinos podem atuar diretamente nos recetores hormonais como hormonas mimólogas ou antagónicas, relativamente à hormona natural. Outros, podem atuar diretamente com as proteínas que controlam o envio de uma determinada hormona à sua célula/tecido alvo (Bergman *et al.*, 2012).

4.2. Grupos de Substâncias disruptoras endócrinas

O grupo de compostos disruptores endócrinos é muito heterogéneo e inclui diversas substâncias e grupos de substâncias (De Coster & Van Larebeke, 2012), nomeadamente, esteroides naturais e sintéticos, bem como as suas formas conjugadas (Hamid & Eskicioglu, 2012), fitoestrogénios, compostos orgânicos oxigenados, surfatantes, compostos policlorados, pesticidas (Birkett, 2003), compostos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (Hamid & Eskicioglu, 2012). Das diversas

categorias de compostos, as hormonas sexuais, sintéticas e naturais, representam o grupo de disruptores endócrinos com poder estrogénico mais elevado mesmo quando presentes em baixas concentrações (Sousa, 2013), em comparação com os fitoestrogénios ou xenoestrogénios (Koh *et al.*, 2008). Estes compostos são suscetíveis à biotransformação e bioconcentração (Lai *et al.*, 2002), com elevado potencial de bioacumulação (Gomes *et al.*, 2004).

As hormonas sexuais naturais e sintéticas, que são objeto de estudo no presente trabalho, respetivamente, 17 β -Estradiol e o 17 α -Ethinilestradiol, pertencentes à lista de vigilância de poluentes aquáticos emergentes, publicada pela União Europeia, são consideradas como compostos com elevado efeito de disrupção endócrina, tornando a sua monitorização no ambiente, de grande relevância (Barreiros *et al.*, 2016; Hamid & Eskicioglu, 2012).

4.3. Enquadramento Legal

A Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro, designada como Diretiva Quadro da Água (DQA), é um instrumento da União Europeia que tem por objetivo estabelecer um enquadramento para a proteção dos diferentes meios aquáticos, nomeadamente, as águas de superfície interiores, de transição, subterrâneas e costeiras (2000). A Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro, transpõe a antedita Diretiva para a ordem jurídica nacional, estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas nacionais (2005), onde se definem os conceitos base para a avaliação do estado da qualidade da água, designadamente:

- “Bom estado químico das águas superficiais, como sendo o estado químico alcançado por uma massa de águas superficiais em que as concentrações de poluentes cumprem as normas de qualidade ambiental definidas em legislação específica.”;
- “Norma de qualidade ambiental, como sendo a concentração de um determinado poluente ou de grupo de poluentes na água, nos sedimentos ou no biota, que não deve ser ultrapassada para efeitos de proteção da saúde humana e do ambiente.”;
- “Substâncias perigosas, as substâncias ou grupos de substâncias tóxicas, persistentes e suscetíveis de bioacumulação, e ainda outras substâncias que suscitem preocupações da mesma ordem.”;
- “Substâncias prioritárias, as substâncias definidas como tal em normativo próprio por representarem risco significativo para o ambiente aquático ou por seu intermédio, sendo a sua identificação feita através de procedimentos de

avaliação de risco legalmente previstos ou, por razões de calendário, através de avaliações de risco simplificadas.”;

- “Substâncias perigosas prioritárias, as substâncias identificadas como apresentando um risco acrescido em relação às substâncias prioritárias, sendo a sua seleção feita com base em normativo próprio relativo a substâncias perigosas ou nos acordos internacionais relevantes.”(2005).

A Lei da Água, estabelece, entre outros, as normas de qualidade ambiental e valores-limite de emissão comuns para determinados grupos ou famílias de poluentes (2005). Neste sentido, foi desenvolvida uma metodologia de identificação de substâncias prioritárias que apresentam maior risco para o ambiente. Assim, a atribuição do carácter prioritário a determinado poluente foi baseada numa avaliação simplificada do seu risco, considerando os seguintes aspetos:

- “Dados relativos ao perigo intrínseco da substância em causa e, em particular, a sua ecotoxicidade aquática e à sua toxicidade humana por vias de exposição aquáticas”;
- “Dados resultantes de monitorização de situações de contaminação ambiental alargada”;
- “Outros elementos comprovados suscetíveis de indicar a possibilidade de contaminação alargada, como o volume de produção ou de utilização da substância em causa e os padrões de utilização”(2000).

Na Decisão n.º 2455/2001/CE (2001) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro, foi estabelecida a lista de substâncias prioritárias, incluindo as substâncias perigosas prioritárias, de acordo com as recomendações estabelecidas na Diretiva 2000/60/CE anteriormente referida. Nesta decisão foram definidas 33 substâncias prioritárias, posteriormente revistas na Diretiva n.º 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, onde se identificaram 16 como substâncias perigosas prioritárias, resumidamente identificadas no Anexo III (2008). De salientar que as normas de qualidade ambiental para a respetiva lista de substâncias prioritárias foram igualmente definidas na diretiva (2008).

A Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de agosto, apresenta uma nova lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água, agora com 45 substâncias prioritárias, sucintamente identificadas no Anexo III (2013). Esta Diretiva aborda igualmente a problemática dos poluentes emergentes, presentes nos meios aquáticos e que poderão apresentar riscos significativos, além das 45

substâncias prioritárias anteriormente identificadas. Surge assim a necessidade de melhorar a qualidade dos dados de monitorização relativos aos efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos dessas substâncias. Neste sentido, o artigo 8ºB da Diretiva 2013/39/EU, estabelece a necessidade de uma lista de vigilância de substâncias para as quais devem ser recolhidos dados de monitorização em toda a União Europeia, por forma a definir as prioridades de vigilância das mesmas (2013).

As substâncias que devem constar na lista são aquelas cujas informações disponíveis indiquem que podem representar um risco significativo para o meio aquático e aquelas cujos dados de monitorização sejam insuficientes. Pretende-se para a primeira lista de vigilância um número máximo de 10 substâncias ou grupos de substâncias com a indicação, de matrizes para a monitorização e o eventual método de análise (2013).

O 17β-Estradiol (E2) e o 17α-Etinilestradiol (EE2) estão presentes na primeira lista de vigilância, com o objetivo de recolher dados de monitorização, por forma a determinar as medidas adequadas para fazer face ao risco que essas substâncias constituem (Parlamento Europeu e do Conselho, 2013). Os limites de deteção obtidos através do método *SPE-LC-MS-MS*, para cada uma destas substâncias foram publicados na Decisão de Execução (EU) 2015/495 da Comissão, de 20 de março, e são respetivamente, de 0,4 e de 0,035 ng/L.

4.4. Fontes de contaminação

A entrada dos compostos disruptores endócrinos, nomeadamente, o 17β-Estradiol e o 17α-Etinilestradiol, nos ecossistemas aquáticos podem ocorrer através de fontes pontuais ou difusas (Rosa, 2008). Em ambos os casos, para as respetivas substâncias, as principais vias de excreção são a urina e as fezes (Ze-hua Liu *et al.*, 2015a), tanto de animais como de humanos. Relativamente à atividade industrial, a origem das hormonas é predominantemente o fluxo de águas residuais que chega às estações de tratamento de água residual (ETAR) (Hamid & Eskicioglu, 2012). As fontes pontuais associadas ao aparecimento destes compostos nos meios aquáticos são os efluentes de descarga das ETAR. No que respeita as fontes difusas, estas estão associadas à infiltração das escorrências provenientes de atividade agropecuária (Esperanza *et al.*, 2007).

O 17β-Estradiol ou E2, é uma hormona natural, também referida como estradiol. Este é o composto com maior presença nos vertebrados, estando associado ao sistema reprodutor feminino e à manutenção dos caracteres sexuais (Barreiros *et al.*, 2016). O 17α-Etinilestradiol ou EE2, é uma hormona sintética derivada da hormona natural E2.

Este composto, é essencialmente utilizado como componente de contraceptivos orais, tendo contudo outras aplicações na medicina, designadamente no tratamento hormonal de substituição e na suspensão do aleitamento materno (Aris *et al.*, 2014).

A excreção destes compostos varia dependendo do género, do estado fisiológico e do desenvolvimento do indivíduo (Barreiros *et al.*, 2016). Segundo o modelo apresentado por Johnson e Williams (2004), os maiores contribuidores para a presença do composto 17 β -Estradiol nos meios aquáticos são as mulheres grávidas, as mulheres em período menstrual e as em pós-menopausa, excretando através da urina e fezes respetivamente 393 μ g/dia, 3,2 μ g/dia e 56,1 μ g/dia. Este modelo considerou que a população de mulheres em período de pós-menopausa, estaria em tratamento de terapia hormonal de substituição utilizando apenas a hormona E2 (Johnson & Williams, 2004).

Com a mesma população alvo, mulheres grávidas, menstruadas e em período pós-menopausa, Johnson *et al.*(2000) apresenta igualmente um método que estima a excreção de E2, tendo obtido respetivamente, 600 μ g/dia, 8 μ g/dia e 4 μ g/dia de E2 excretado (Hamid & Eskicioglu, 2012)

Como referido anteriormente, a indústria pecuária tem um peso relevante na excreção de hormona E2. A utilização de estrume como fertilizante, produzido neste tipo de indústria, combinado com a urina excretada pelos animais, aquando da presença de chuva, infiltra esta hormona no solo e dessa forma atinge os lençóis freáticos (Burkholder *et al.*, 2007; Hanselman *et al.*, 2003; Kolodziej *et al.*, 2004; Lorenzen *et al.*, 2004; Matthiessen *et al.*, 2006).

Um estudo realizado em Inglaterra estima que, se 1% dos estrogénios excretados pela indústria pecuária atingisse os meios aquáticos, essa percentagem representaria 15% de todos os compostos estrogénicos na água (Johnson *et al.*, 2006). Dados recentes apontam para uma variação de concentração do composto E2 excretado por animais entre 30 a 2500 ng/L (Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010).

Relativamente ao composto 17 α -Ethinilestradiol, a maior fonte para o ambiente, como já fora antes referida, é a população que ingere contraceptivos orais (Xu *et al.*, 2012). Para a elaboração de um modelo, Johnson e Williams, admitiram que 17% do total da população de indivíduos do sexo feminino de países ocidentais consome a pílula contraceptiva regularmente. Tendo em conta que apenas essa fonte de EE2 foi considerada para o estudo, verificou-se que em média se excretam 10,5 μ g/dia de EE2 (Hamid & Eskicioglu, 2012; Johnson & Williams, 2004).

Apesar do composto EE2 estar presente nos meios aquáticos em concentrações baixas, a sua baixa biodegradabilidade pode significar que este é um dos fatores que determina o poder estrogénico do efluente final de uma estação de tratamento de água residual (Pickering & Sumpter, 2003).

4.5. Propriedades físico-químicas dos fármacos

A hormona natural estudada no presente trabalho é um esteroide o isómero 17β do Estradiol, constituído por 18 carbonos (C18), com dois anéis ciclohexanos, um anel ciclopentano e um fenol, contendo grupos hidroxilo na posição 3 e em 17β como está representado na Figura 4.1 (Hamid & Eskicioglu, 2012; National Center for Biotechnology Information, 2016a). Caracterizada como sendo a hormona mais potente produzida pelos ovários (National Center for Biotechnology Information, 2016a).

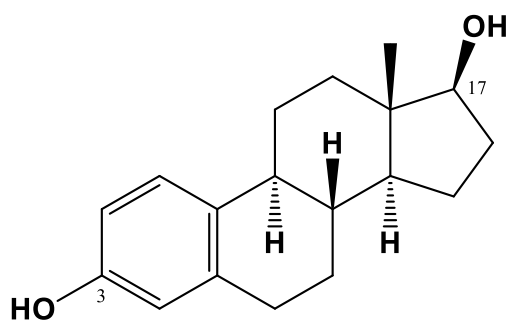


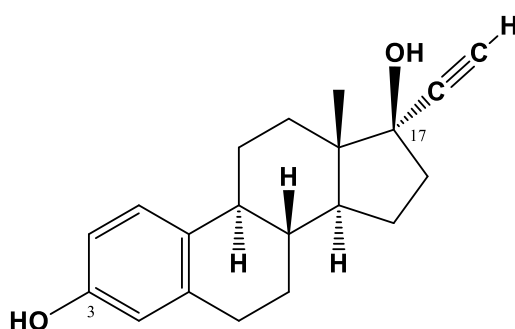
Figura 4.1. Estrutura química do composto 17β-Estradiol.

Na Tabela 4.1 resumem-se as características físico-químicas principais do composto 17β-Estradiol.

Tabela 4.1. Propriedades físico-químicas do composto 17β-Estradiol.

Fórmula Molecular	C₁₈H₂₄O₂	(National Center for Biotechnology Information, 2016a)
Peso Molecular (g/mol)	272,38	(Hamid & Eskicioglu, 2012; Ze-hua Liu <i>et al.</i> , 2015b; National Center for Biotechnology Information, 2016a; Tomšková <i>et al.</i> , 2012)
CAS	50-28-2	(American Chemical Society, 2016)
Solubilidade em água (mg/L a 20 °C)	13	(Ying <i>et al.</i> , 2002)
Log K_{ow}	4,01	(Hamid & Eskicioglu, 2012; Ze-hua Liu <i>et al.</i> , 2015b; Tomšková <i>et al.</i> , 2012)
	3,94	(Ying <i>et al.</i> , 2002)
pK_a	10,4	(Hamid & Eskicioglu, 2012; Tomšková <i>et al.</i> , 2012)
Potencial Estrogénico	1	(Hamid & Eskicioglu, 2012; Metcalfe <i>et al.</i> , 2001; Rutishauser <i>et al.</i> , 2004; Teske & Arnold, 2008)
Constante da lei de Henry (Pa m³/mol)	6,3x10⁻⁷	(Hamid & Eskicioglu, 2012)

Quanto ao composto 17α-Etinilestradiol, representado na Figura 4.2., identificado como um estradiol alquilado semissintético, com uma substituição na posição 17α-etinil, apresenta-se exatamente igual ao 17β-Estradiol na restante estrutura (National Center for Biotechnology Information, 2016b). Esta hormona liga-se ao recetor complexo de estrogénio e entra no núcleo, ativando a transcrição dos genes no DNA envolvidos na resposta celular estrogénica. O 17α-Etinilestradiol é responsável pela inibição da 5α-reductase no tecido epididimal que reduz os níveis de testosterona, podendo ocasionar uma redução da progressão do cancro da próstata (National Cancer Institute, 2016).



Na Tabela 4.2 são apresentadas as propriedades físico-químicas do composto 17 α -Ethinilestradiol.

Tabela 4.2. Propriedades físico-químicas do composto 17 α -Ethinilestradiol.

Fórmula Molecular	C₂₀H₂₄O₂	(National Center for Biotechnology Information, 2016a)
Peso Molecular (g/mol)	296,4	(Hamid & Eskicioglu, 2012; National Center for Biotechnology Information, 2016b; Tomšková <i>et al.</i> , 2012)
CAS	57-63-6	(American Chemical Society, 2016)
Solubilidade em água (mg/L a 20 °C)	4,8	(Ying <i>et al.</i> , 2002)
Log K_{ow}	3,67	(Hamid & Eskicioglu, 2012; National Center for Biotechnology Information, 2016b)
	4,106	(Tomšková <i>et al.</i> , 2012)
	4,15	(Ying <i>et al.</i> , 2002)
pK_a	10,46-10,70	(Hamid & Eskicioglu, 2012)
	10,24	(Tomšková <i>et al.</i> , 2012)
Potencial Estrogénico	0,38	(Metcalf <i>et al.</i> , 2001)
	1,19⁽¹⁾	(Rutishauser <i>et al.</i> , 2004)
	0,70⁽²⁾	
	1,62⁽³⁾	
	1,5	(Hamid & Eskicioglu, 2012)
Constante da lei de Henry (Pa m³/mol)	3,8x10⁻⁷	(Hamid & Eskicioglu, 2012)

⁽¹⁾ Resultado obtido num ensaio YES (*yeast estrogen screen*)

⁽²⁾ Resultado obtido num ensaio ZRP (*zona radiata proteins production*)

⁽³⁾ Resultado obtido num ensaio RTG-2 (*rainbow trout gonad cell line RTG-2*)

Propriedades como a solubilidade em água e o coeficiente octanol/água (K_{ow}) são cruciais para perceber o comportamento destes compostos no ambiente (Barreiros *et al.*, 2016). Estes parâmetros podem ser utilizados para aferir o carácter hidrofóbico dos compostos (Danielsson & Zhang, 1996) e consequentemente usados para prever a tendência que os compostos têm à sorção aos sólidos (Wien & Mikrobiologie, 1999). Os valores do coeficiente octanol/água (K_{ow}) aumentam proporcionalmente com o aumento da lipofilicidade, correlacionando-se inversamente com a solubilidade em água. Assim, valores de K_{ow} elevados são uma característica de moléculas hidrofóbicas de maiores

dimensões, com tendência a se ligarem a matéria orgânica sólida, enquanto que moléculas hidrofílicas de menores dimensões, tem valores de K_{ow} reduzidos. Este parâmetro afigura-se como um indicador de excelência para avaliar a capacidade de adsorção dos compostos face ao parâmetro solubilidade (Langford & Lester, 2003). Como referencial, valores de K_{ow} menores que 2,5 demonstram um potencial de sorção baixo e valores de K_{ow} superiores a 4 demonstram um potencial de sorção elevado (Rogers, 1996).

O comportamento de partição de um composto orgânico depende significativamente do estado em que este se encontra, ionizado ou neutro. A constante de dissociação de um ácido (K_a), descreve a tendência que determinado químico tem a doar protões à solução, a receber eletrões da solução ou a manter-se no estado neutro, num determinado pH. O cologaritmo, pK_a , é utilizado para facilitar a comparação com o pH. As formas ionizadas e neutras de ácidos orgânicos estão em concentrações iguais quando o $pK_a=pH$. A forma neutra de um determinado ácido orgânico adsorve mais à matéria particulada do que a forma ionizada, e, portanto, torna-se mais fácil de remover no tratamento de águas residuais (Jordan *et al.*, 2010).

A constante da lei de Henry, determina que a concentração de uma espécie química numa solução líquida, é proporcional à sua fase gasosa a pressão parcial. Mais genericamente, esta constante é utilizada para prever a tendência de um determinado composto químico para volatizar do seu solvente (neste caso a água). Quanto menor for a constante, menor a probabilidade do químico estar presente no ar e mais provável que este permaneça no seu solvente (Jordan *et al.*, 2010).

4.6. Implicações no ambiente e na saúde pública

Na década de 70 iniciaram-se as primeiras investigações relacionadas com fenómenos de disrupção endócrina originadas pela observação de anomalias nos ecossistemas aquáticos (Blaber, 1970; Smith, 1971). A constatação da falha do sistema reprodutivo em populações de peixes de água doce, observada na década de 90, veio intensificar a necessidade de investigação nesta área (Hintemann *et al.*, 2006).

Na última década, diversos estudos revelam casos de anormalidades genitais em espécies de peixes e de outros organismos, tal como hermafroditismo, causados pela síntese da proteína vitelogenina (VTG), alarmando a comunidade científica a respeito do efeito de compostos estrogénicos no ambiente (Arcand-Holy *et al.*, 1998; Hogan *et al.*, 2006; Iwanowicz *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 1999; Safe, 2004). A *Endocrine Society*, publicou em 2009, um relatório de estado de arte, onde expressa a preocupação que a exposição crónica a compostos disruptores endócrinos, possa ocasionar efeitos

adversos na saúde humana, em baixas concentrações (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009)

A VTG é uma glicoproteína precursora, sintetizada no fígado de peixes fêmea controlada pelos estrogênios. A VTG não sendo produzida por peixes machos ou juvenis, a sua produção no fígado pode ser induzida perante a exposição a compostos estrogénicos (Woods & Kumar, 2011). Assim, a vitelogenina tornou-se um dos mais comuns biomarcadores utilizados para aferir a exposição dos peixes a compostos estrogénicos (Hutchinson *et al.*, 2006). Diversos estudos laboratoriais comprovaram que a presença de E2 (Brion *et al.*, 2004; Folmar *et al.*, 2000; Hill & Janz, 2003) e de EE2 (Brion *et al.*, 2004; Hill & Janz, 2003; Jobling *et al.*, 2009; Nash *et al.*, 2004), estimulam a produção de VTG.

Anomalias físicas são também consideradas como uma resposta comum à exposição em laboratório a compostos disruptores endócrinos. Muitos dos efeitos documentados dizem respeito a alterações no crescimento genital e dos tecidos biológicos, no geral. Segundo o estudo feito por Van den Belt *et al.* (2002), a exposição do peixe-zebra (*Danio rerio*) a EE2, demonstrou um efeito negativo no índice gonado-somático, sendo posteriormente justificado pela ausência de vitelogenina em oócitos maduros dentro dos ovários. Em peixes-zebra machos, a presença de 50 ng/L de EE2, afetou negativamente o crescimento genital (Nash *et al.*, 2004). Outros efeitos foram relatados, tal como a fibrose testicular em *Cyprinodon variegatus*, quando expostos a 2 ng/L de EE2 (Zillioux *et al.*, 2001) e em *Oryzias latipes* (peixe-arroz), quando expostos a 463 ng/L durante três semanas (Kang *et al.*, 2002). Relativamente à hormona natural, Flammation *et al.* (2000), observou que, após duas injeções de 2 mg/Kg de E2, numa experiência de 14 dias, resultou na degeneração dos espermatozoides em *Leuciscus cephalus*. Este tipo de alterações que surgem nas espécies, alteram a capacidade reprodutiva dos indivíduos afetados, apesar das consequências reprodutivas não serem conclusivas (Jordan *et al.*, 2010).

A exposição a compostos disruptores endócrinos afeta também outro tipo de órgãos, nomeadamente o fígado e os rins. Efeitos de nefrotoxicidade no rim e no fígado, foram observados em peixes-zebra, quando expostos a 10 ng/L de EE2 (Weber *et al.*, 2003). Liney *et al.* (2006) observou que os rins dos peixes teleósteos são sensíveis à exposição a compostos estrogénicos provenientes de águas residuais. Estes órgãos, são essenciais na realização de funções metabólicas e imunológicas, pelo que, é de esperar que estes efeitos resultem numa diminuição do número de indivíduos da espécie exposta, afetando posteriormente a sua longevidade e sobrevivência no meio. (Jordan

et al., 2010). Contrariamente, foi documentado, que a exposição do peixe esgana-gato (*Gasterosteus aculeatus*) ao composto EE2, acelerou o seu crescimento (Bell, 2004). Assim, apesar da diversidade de documentos publicados que observam modificações nas funções de diversos órgãos, e que realçam o seu potencial negativo na sobrevivência dos indivíduos em estudo, ainda existem algumas dúvidas relativas às reais consequências aquando da exposição a compostos disruptores endócrinos (Jordan *et al.*, 2010).

A exposição a estes compostos presentes no ambiente é, igualmente, um fator de risco para a saúde pública, podendo relacionar-se com diversos efeitos, nomeadamente a síndrome de disgenesia testicular, a hipospadia, o cancro testicular e da mama, a endometriose e o decréscimo do número de espermatozoides (Adlercreutz *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 2003; Skakkebaek *et al.*, 2001). Contudo, a incerteza no meio científico, em relação à natureza e à magnitude dos riscos que podem ocorrer mediante a exposição a concentrações baixas destes compostos estrogénicos, permanece (Safe, 2004). A problemática dos EDC e de outros compostos químicos relativamente à sua exposição no ambiente, é a impossibilidade de concretizar um limite para os seus efeitos adversos na saúde pública, especialmente para populações mais vulneráveis (Wise *et al.*, 2011).

4.7. Remoção dos fármacos em ETAR

A remoção de esteroides e de outros micropoluentes orgânicos da água, pode ser feita, através de dois tipos de abordagem: i) através da otimização das tecnologias de tratamento previamente existentes; ii) através da implementação de nova tecnologia para fim de linha de tratamento (Koh *et al.*, 2008).

Tipicamente, o tratamento de água residual, é obtido através de um processo com três estágios, designados de, pré-tratamento, tratamento primário e tratamento secundário (Koh *et al.*, 2008), podendo ou não conter um tratamento terciário, mediante as exigências legais aplicadas ao tipo de meio recetor da descarga (Ministério do Ambiente, 1997). Contudo, o processo de biodegradação e biotransformação de compostos esteroides pode começar antes da chegada da água residual afluente à estação de tratamento. Em locais cuja bacia hidrográfica correspondente à área de recolha da estação de tratamento é muito abrangente, o tempo de retenção da massa de água residual nos sistemas de drenagem pode ser significativo, permitindo o crescimento bacteriano nas paredes internas das tubagens. O crescimento deste biofilme induz os processos de alteração estrutural anteriormente referidos (Langford & Lester, 2003).

Relativamente à remoção da atividade estrogénica de águas residuais, foi provado que a etapa de tratamento biológico é o processo mais relevante (Koh *et al.*, 2008). Processos como a biotransformação e a biodegradação desempenham um papel importante na remoção de estrogénios, dado que alguns microrganismos presentes no tratamento biológico das ETAR têm a capacidade de utilizar este tipo de compostos e outros micropoluentes como fonte de carbono para responder as suas necessidades metabólicas. Os processos de degradação mais rápidos e eficazes, deste tipo de poluentes, dão-se em condições aeróbias (Moharikar *et al.*, 2005).

Diversos estudos comprovam a capacidade da bactéria nitrificante, *Nitrosomonas europaea*, juntamente com um processo biológico de lamas ativadas com nitrificação, de remover E2 e EE2 presentes no efluente da ETAR (Shi *et al.*, 2004; Vader *et al.*, 2000). Assim, a dinâmica da população de microrganismos está intimamente dependente do tipo de processo de tratamento biológico de uma estação de tratamento de água residual (Rodrigues, 2009).

Na Tabela **4.3**, são apresentados diversos exemplos de tratamento biológico e a respetiva remoção dos compostos E2 e EE2.

Tabela 4.3. Tipos de tratamento biológico para a remoção dos compostos E2 e EE2.

Tipo de tratamento secundário	Compostos	Eficiência de Remoção (%)	Referências
Dois Biofiltros em série com dois estágios de pós-sedimentação	E2	82	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
Processo de lamas ativadas convencional	E2	86	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
	EE2	85	
	E2 EE2	>94 65	(Esperanza <i>et al.</i> , 2004)
Processo de lamas ativadas com remoção de nutrientes	E2 EE2	70 - 80 <40	(Ifelebuegu, 2011)
	E2 EE2	80 - 100 60 - 80	(Clara <i>et al.</i> , 2005)
	E2 EE2	≈100 70 - 80	(Ifelebuegu, 2011)
Vala de oxidação seguida de um Biofiltro	E2 EE2	≈98 ≈90	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
	E2 EE2	90 - 100 ≈40	(Ifelebuegu, 2011)
Discos Biológicos	E2 EE2	80-90 n.d.	(Ifelebuegu, 2011)
Reactor biológico de membrana com remoção de azoto	E2 EE2	80 - 100 60 - 80	(Clara <i>et al.</i> , 2005)
Biofiltro granular sequencial em funcionamento Batch (SBBGR) ^[1]	E2 EE2	85 84	(Balest <i>et al.</i> , 2008)
Lagoa facultativa seguida de duas Lagoas de maturação	E2 EE2	81 30^[2]	(Pessoa <i>et al.</i> , 2014)
	E2 EE2	81 99^[2]	
Lagoa Facultativa	E2 EE2	62 58	
Reactor anaeróbio de fluxo ascendente (UASB)	E2 EE2	87 94	

^[1] Instalação piloto.

^[2] A diferença de resultados deve-se à diferença de população. A ETAR cuja remoção de EE2 é apenas de 30%, trata o efluente de 23 870 habitantes, a ETAR cuja remoção é de 99%, trata o efluente de 3000 habitantes. A entrada de EE2 é mais elevada na situação de remoção de 30%.

Das opções de tratamento biológico apresentadas, as que contemplam a remoção de nutrientes, nomeadamente azoto e fósforo, obtêm maior eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2. A remoção biológica de azoto, envolve reações de nitrificação e desnitrificação. Segundo *Andersen et al.* (2003) e *Servos et al.* (2005), os estrogénios naturais são biologicamente degradados nos processos de desnitrificação e nitrificação, aplicados a um sistema de lamas ativadas. Já o composto sintético, EE2, só se degradava no tanque de nitrificação. Através de um modelo, *Joss et al.* (2004), descreveu a influência destas reações complexas de *redox* na eficiência de remoção de estrogénios.

De acordo com a Tabela 4.3 apresentada anteriormente, a eficiência de remoção dos compostos em análise, associada ao tratamento secundário, é diferente, dependendo de diversos fatores, nomeadamente a variação das concentrações de entrada na estação, do tipo de tratamento biológico e das condições operacionais dos mesmos nomeadamente a temperatura, tempo de retenção hidráulico e idade de lamas (Ze hua Liu *et al.*, 2009). Um aumento do tempo de retenção hidráulico favorece a remoção de compostos recalcitrantes existentes na água e uma idade de lamas mais elevada permite maior variabilidade de microrganismos (Barbosa *et al.*, 2016). Mediante estes aspetos, o tratamento biológico não tem a capacidade de remover na totalidade os compostos que se encontram a concentrações na ordem dos µg/L e ng/L (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009; Morasch *et al.*, 2010), tornando as ETAR a maior origem destes compostos para os meios aquáticos (Moreira *et al.*, 2016).

De forma a contornar esta problemática e a alcançar melhores eficiências de remoção, têm sido investigados diferentes processos para a remoção de micropoluentes (Moreira *et al.*, 2016). Na Tabela 4.4, são identificados alguns dos processos de tratamento terciário utilizados para a remoção de micropoluentes.

Tabela 4.4 Tipos de tratamento terciário para a remoção dos compostos E2 e EE2.

Tipo de tratamento Terciário		Compostos	Eficiência de remoção (%)	Referências
Lagoa de Macrófitas		E2 EE2	≈60 n.d.	(Ifelebuegu, 2011)
Filtros de Areia		E2 EE2	0 - 10 ^[1] 0 - 10 ^[1]	(Ifelebuegu, 2011)
		E2 EE2	10 - 20 ^[1] ≈10 ^[1]	
Reator enzimático de membrana		E2 EE2	87 85	(Lloret <i>et al.</i> , 2013)
Processos avançados de oxidação, AOPs	Ozonização	E2	95	(Auriol <i>et al.</i> , 2006)
		E2 EE2	>90 >90	(Huber <i>et al.</i> , 2005)
	Cloração	E2	100	(Hu <i>et al.</i> , 2003)
		EE2	100	(Moriyama <i>et al.</i> , 2004)
	Óxido de Manganês (MnO ₂)	EE2	81,7	(De Rudder <i>et al.</i> , 2004)
	Dióxido de Titânio (TiO ₂) +UV	E2	98	(Ohko <i>et al.</i> , 2002)
	Dióxido de Titânio (TiO ₂)	E2	99	(Coleman <i>et al.</i> , 2000)
	Ultrasons	E2 EE2	80 - 90 80 - 90	(Kim <i>et al.</i> , 2015; Suri <i>et al.</i> , 2007; Suri <i>et al.</i> , 2010)
Nanofiltração		E2 EE2	71 92	(Pereira <i>et al.</i> , 2012)

^[1] A diferença existente nos valores de eficiência de remoção deve-se ao número de habitantes que cada tipo de tratamento abrange. O filtro de areia com maior eficiência de remoção abrange o tratamento de efluente proveniente de 41 043 habitantes, o filtro de areia com menor eficiência abrange o tratamento de efluente de 392 743 habitantes.

Os processos avançados de oxidação (AOPs) permitem a oxidação de compostos orgânicos através de reações de primeira ordem com radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Glaze *et al.*, 1987). Normalmente, são processos que envolvem dois estágios, o primeiro, passa pela formação dos radicais hidroxilo e o segundo pela reação destes agentes oxidantes com os contaminantes orgânicos. Os AOPs são considerados uma tecnologia de remoção de poluentes orgânicos muito competitiva, uma vez que os compostos em questão normalmente têm uma elevada estabilidade química e reduzida biodegradabilidade, tornando-os mais difíceis de tratar através de técnicas mais convencionais (Oller *et al.*, 2011). Contudo, é de notar, que para determinadas circunstâncias, os AOPs podem, por outro lado, induzir efeitos negativos, nomeadamente, libertar subprodutos ou produtos da transformação, nocivos e reativos

com a água ou outros micropoluentes, podendo ter efeitos sinérgicos no ambiente (H. sang Kim *et al.*, 2007; Lee & Von Gunten, 2009; Shappell *et al.*, 2008).

4.8. Reatores de Discos Biológicos e sua aplicabilidade

A utilização de reatores de discos biológicos para o tratamento de água residual ganhou popularidade nos anos 70 (Su *et al.*, 2015), nomeadamente, enquanto tratamento secundário ou como tratamento secundário avançado. As vantagens deste tipo de sistema são diversas, designadamente, a sua simplicidade e facilidade de operação, baixos custos energéticos e de manutenção (Water Environment Federation, 2011), e a elevada eficiência de degradação de matéria orgânica (Hassard *et al.*, 2015). Todavia, perante picos de caudal afluente, o biofilme que se encontra nos discos pode separar-se dos mesmos, afetando negativamente o processo (Water Environment Federation, 2011). Os discos biológicos têm a vantagem de se conseguirem operar para nitrificação e desnitrificação, simultaneamente, devido à presença de gradientes no biofilme, que promove condições aeróbias, anaeróbias e anóxicas (Dutta *et al.*, 2007; Hiras *et al.*, 2004; Tawfik *et al.*, 2005). Constitui também uma vantagem deste tipo de processo a área diminuta exigida para implantação, tornando-o muito versátil (Su *et al.*, 2015).

O sistema de discos biológicos é caracterizado por ser um processo de biomassa fixa, constituído por um ou mais módulos de discos espaçados entre si, normalmente de plástico, poliestireno ou de policloreto de vinilo (PVC), que rodam sobre si mesmos. A unidade de discos biológicos encontra-se parcialmente submersa na água residual, tipicamente a 40% do disco (Tchobanoglous *et al.*, 2003). O mecanismo de rotação do disco, o rotor e o veio metálico onde se encontram os discos, pode atingir velocidades de rotação entre 1 e 10 rpm, com o auxílio de um motor. A rotação dos discos permite o arejamento da água residual bem como a exposição ao ar dos microrganismos presentes na água, promovendo assim, as condições aeróbias ótimas para a fixação, criação de um biofilme consistente e, conseqüentemente a degradação pretendida da matéria orgânica (Patwardhan, 2003).

Os reatores de discos biológicos, podem dispor-se em paralelo ou em série, dependendo dos objetivos de qualidade para o efluente final. Geralmente, quando o problema é a qualidade do efluente, os discos biológicos funcionam em série, por forma a obterem melhores eficiências de remoção. É igualmente possível modificar o processo de tratamento dos reatores de discos biológicos, através do aumento da submersão do disco para 70-90%. Esta alteração potenciará condições anaeróbias favoráveis aos processos que requerem níveis baixos de oxigénio, como a desnitrificação (Teixeira & Oliveira, 2000).

Relativamente à presença de compostos poluentes, tem sido crescente o número de evidências que sugerem a capacidade dos discos biológicos para a remoção de compostos contaminantes, tais como hidrocarbonetos, metais pesados, xenobióticos e produtos de cuidado pessoal, em condições processuais apropriadas (Jeswani & Mukherji, 2012; Novotný *et al.*, 2012; Orandi *et al.*, 2012; Simonich *et al.*, 2002).

Tabela 4.5 Exemplo de compostos orgânicos e inorgânicos removidos através de discos biológico.

Tipo	Composto	Observações	Referência
Compostos orgânicos	2-Fluorofenol C_6H_5FO	Inocularam uma estirpe de microrganismos capazes de degradar o composto 2-Fluorofenol e demonstrou o aumento de eficiência de remoção em condições de constante afluência do poluente. A afluência variável do poluente, afetou a eficiência de remoção negativamente, apesar da estirpe permanecer no biofilme.	(Duque <i>et al.</i> , 2011)
	4-Fluorocinâmico $C_9H_7FO_2$	Estudaram do impacto de picos de afluência do ácido 4-Fluorocinâmico num reator de discos biológicos. A eficiência de remoção deste composto aumentou de 8% para 46% com o acréscimo da carga superficial de 73 g/m ² .d para 168 g/m ² .d, respetivamente.	(Amorim <i>et al.</i> , 2013).
Composto inorgânico	Níquel (Ni) e Chumbo (Pb)	Obtiveram eficiências de remoção de metais pesados, com a utilização de discos biológicos de, 74% para remoção de níquel (Ni) e de 85% de remoção para chumbo (Pb).	(Sirianuntapiboon & Chumlaong, 2013).

A simplicidade, adaptabilidade, a reduzida necessidade de manutenção e a área de implantação, sugerem que a utilização dos reatores de discos biológicos para tratamento de água residual nas respetivas estações, continuará a evoluir nos próximos anos (Hassard *et al.*, 2015).

4.9. Biofilme

O biofilme é uma estrutura coerente constituída por células microbianas que aderem entre si a uma superfície sólida. As células encontram-se envolvidas por uma matriz, resultante dos seus próprios produtos de excreção, designada por Substância Polimérica Extracelular (*EPS*), genericamente composta por DNA extracelular, água, proteínas e polissacarídeos, permitindo o desenvolvimento de comunidades resilientes (Ibrahim *et al.*, 2012). A estrutura do biofilme está intimamente relacionada com o tipo de reator em que se desenvolve e com o tipo de microrganismos presentes. No que concerne ao tipo de reator, destacam-se as condições hidrodinâmicas e o substrato disponível afluente que contacta com o biofilme (Rodrigues, 2009).



Figura 4.3 Cinco estágios de desenvolvimento do biofilme. **1** - Adesão inicial; **2** - Adesão irreversível; **3** - Maturação I; **4** - Maturação II; **5** - Dispersão. (Fonte: Kaplan, Ragunath, Ramasubbu, & Fine, 2003).

Um aspecto de extrema relevância no desenvolvimento do biofilme é o mecanismo de *Quorum sensing* (QS), que envolve a produção e o envio de sinais químicos pelas bactérias estabelecendo assim a comunicação e interação entre as células (Rolim, 2014). Os microrganismos utilizam este sistema para monitorizar a densidade populacional e o metabolismo, ativando a expressão de um gene específico, permitindo um desenvolvimento coordenado. Pensa-se que este mecanismo possa estar envolvido em todas as fases de crescimento do biofilme (Feng *et al.*, 2013).

Como já fora referido anteriormente, o substrato é um parâmetro estrutural no crescimento do biofilme. A primeira camada de biofilme que se forma numa determinada superfície, têm contacto direto com o meio aquoso, assim como os nutrientes e o oxigénio são transportados para o interior da célula através de mecanismos de difusão molecular. Contudo, perante o aumento da quantidade de substrato, haverá maior crescimento de biofilme. A saturação da superfície de suporte com microrganismos, torna a estrutura do biofilme menos porosa, dificultando a entrada de oxigénio e nutrientes nas camadas subjacentes. Quando as concentrações de substrato são menores, este é rapidamente consumido pelas camadas externas do biofilme, proporcionando situações de competição pelo alimento. Esta ausência de substrato retardará o crescimento do biofilme, resultando em estruturas altamente porosas (Wijeyekoon *et al.*, 2004).

A atividade microbiológica do biofilme não é proporcional à quantidade de biomassa fixa, mas aumenta com a espessura do biofilme até um determinado nível estável, considerada como a “espessura ativa”. (Lazarova & Manem, 1995). Quando a difusão de nutrientes, vitaminas e oxigénio diminui, criam-se as condições para a existência de microrganismos metabolicamente inativos. De notar, que toda a atividade de desenvolvimento microbiológico está limitado pelo espaço, levando a situações de competição. Esta condição é semelhante à fase estacionária que se desenvolve em laboratório. Durante a fase estacionária, os microrganismos alteram a sua fisiologia, aumentando a produção de metabolitos. Estes funcionam igualmente como sinais químicos, por forma a iniciar o processo de formação de biofilme ou para inibir a

formação de biofilme por outros microrganismos que partilham o mesmo habitat, de forma a tornar-se uma estrutura mais estável (Vlamakis *et al.*, 2010).

No que se refere a tratamento de água residual, a espessura do biofilme é crucial para a purificação da massa de água. Como o oxigénio só é absorvido até uma determinada profundidade do biofilme, as camadas interiores (aquelas que dizem respeito ao interior do biofilme e não à proximidade ao meio de suporte) entram em estados de anoxia e anaerobiose, promovendo o desenvolvimento de bactérias anaeróbias. Nas camadas exteriores, a espessura ativa, o biofilme é complexo, contendo protozoários, metazoários, filamentosas e alguns vertebrados (Lazarova & Manem, 1995). Estes microrganismos heterotróficos desempenham uma função fundamental no tratamento de água residual, a degradação de matéria orgânica. Considera-se que apenas a camada superficial dos biofilmes é eficiente em processos oxidativos, e por consequente para a água residual ser tratada só seria necessária uma camada superficial de biofilme (Feng *et al.*, 2013).

São inúmeros os benefícios que uma comunidade bacteriana obtém através da formação de biofilmes. Estes conferem resistência a agentes antimicrobianos e proteção de agentes hostis. Uma possível explicação para o aumento da resistência dos biofilmes perante *stress* ambiental, é a presença e aumento de células persistentes no biofilme. Apesar de serem geneticamente idênticas à restante população, as células persistentes são resistentes a diversos antibióticos e não se multiplicam. Este tipo de células tem sido proposta como possível proteção contra a ação de antibióticos, uma vez que possui um sistema toxina-antitoxina, bloqueando-os (Lewis, 2005).

Um biofilme estável e com uma espessura fina, poderá oferecer diversas vantagens no tratamento de água residual (Lazarova & Manem, 1995), nomeadamente na remoção de micropoluentes como aqueles que foram estudados.

4.10. Métodos e técnicas de quantificação de compostos disruptores endócrinos

- Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE)

A preparação da amostra é uma das principais etapas para o processamento analítico e torna-se mais importante quanto maior for a complexidade da amostra e quanto menor forem as concentrações a serem detetadas (Sánchez *et al.*, 2014). Esta etapa envolve procedimentos de limpeza e de pré-concentração da amostra, de forma a melhorar a sensibilidade, a especificidade e a seletividade dos métodos analíticos adotados. Atualmente, as tendências na área da química analítica, é a minimização das diversas

etapas na preparação de amostra, de forma a reduzir os reagentes e resíduos tóxicos associados ao processo (Galuszka *et al.*, 2013; Spietelun *et al.*, 2013).

Na última década, as técnicas mais comuns de preparação de amostra baseiam-se no método de extração, designadamente, a micro-extração em fase sólida (*SPME*), a extração em fase sólida (*SPE*), a micro-extração líquido-líquido (*MLLE*), a extração líquido-líquido dispersiva (*DLLE*) e a extração sortiva em barra de agitação (*SBSE*). Estas técnicas são populares pela reduzida produção de resíduos tóxicos e pela sua ampla aplicabilidade para diversas famílias de compostos em diferentes áreas de análise. A técnica *SBSE* foi introduzida por *Baltussen et al* (1999) que propôs uma nova aplicação utilizando um polímero, polidimetilsiloxano (*PDMS*), como material sorvente na fase de extração. Este material envolve um tubo selado onde se encontra a barra magnética que permite a agitação (Sánchez *et al.*, 2014). Este polímero apresenta propriedades apolares que promovem a interação com compostos hidrofóbicos, nomeadamente os compostos disruptores endócrinos, não sendo tão eficiente na extração de grupos de compostos polares ($K_{ow} < 3$) (Hoeck, 2009; Nogueira, 2012).

A metodologia *SBSE* é aplicada, introduzindo diretamente na amostra líquida a barra de agitação. Enquanto a barra estiver em agitação, irá adsorver os compostos orgânicos que se pretendem extrair da solução. Após este processo, a barra é removida da amostra, limpa com água desmineralizada e seca. Depois do procedimento de sorção, os compostos têm de ser removidos da barra, para tal esta é introduzida num *vial* com um reagente que promova a dessorção dos compostos a analisar. Posteriormente a amostra é introduzida para quantificação num equipamento de cromatografia líquida ou gasosa (Sánchez *et al.*, 2014).

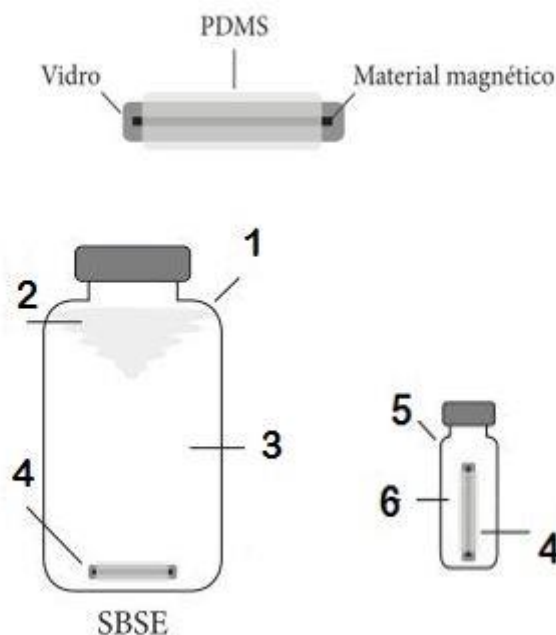


Figura 4.4 Representação esquemática da SBSE (em cima), do modo de extração (em baixo, à esquerda) e do modo de dessorção (em baixo, à direita) usados na técnica SBSE. **1** - Frasco de amostragem; **2** - Vortex; **3** - Amostra; **4** - Barra de agitação SBSE; **5** - Vial; **6** - Solvente para dessorção. Fonte: (Nogueira, 2012).

A capacidade de sorção do PDMS que envolve as barras SBSE varia tipicamente entre 24 a 126 μL , sendo substancialmente mais elevada que a capacidade máxima da técnica SPME, cujo volume máximo é de 0,5 μL . Consequentemente, a técnica SBSE permite o aumento entre 50 a 250 vezes da sensibilidade do método, o que permite a diminuição dos limites de detecção (Almeida & Nogueira, 2006).

Esta técnica prima como sendo uma abordagem pouco dispendiosa, comparativamente com outras alternativas, reutilizável, de fácil implementação, exigindo menor volume de amostra e muito promissora na monitorização de compostos emergentes em diversas áreas científicas (Nogueira, 2012).

- Cromatografia líquida de alta performance com detetor de fotodíodos

Na última década, têm sido propostas diversas técnicas analíticas para monitorizar a presença de compostos estrogénicos na água, nomeadamente através de ensaios biológicos ou por técnicas cromatográficas (Alda & Barceló, 2001; Ingrand *et al.*, 2003; Kurecková *et al.*, 2002; Quintana *et al.*, 2004; Tienpont *et al.*, 2002). Contudo, as últimas são o sistema analítico preferencial, uma vez que permitem identificar analitos individuais de interesse (Almeida & Nogueira, 2006).

As ferramentas de análise cromatográfica comumente utilizadas para detecção de estrogénios e grande parte dos compostos disruptores endócrinos em água, são a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia gasosa (GC) seguidas por um detetor de massa (MS) ou por dois MS em série (Briciu *et al.*, 2009; Görög, 2011; Hamid & Eskicioglu, 2012; Kozłowska-Tylingo *et al.*, 2016). Contudo, este tipo de instrumentação é sofisticada e geralmente requiere maior investimento de capital e de formação, para a sua utilização. A complexidade de algumas matrizes reais, dificulta igualmente a utilização deste equipamento, uma vez que o processo de preparação de amostra se torna mais difícil de concretizar, com o risco de perda de analitos devido aos extensos processos de extração e das diversas etapas de lavagem (Hamid & Eskicioglu, 2012).

Como alternativa viável, surge a cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) seguida de um detetor de fotodíodos (*diode array*). A utilização deste equipamento analítico é amplamente aceite como, uma técnica vantajosa para a monitorização de hormonas esteroides, uma vez que se trata de uma opção mais robusta e versátil, sem a necessidade de etapas de derivação na preparação da amostra (Huang *et al.*, 2008). No HPLC os compostos, que se encontram em fase líquida, são separados, geralmente, em condições de fase reversa (Rangel, 2010). Para tal, são utilizadas colunas cromatográficas, constituídas por materiais apolares e percorridas por uma fase móvel líquida, relativamente polar, normalmente contendo água. Após a separação, dissociação dos analitos na coluna, estes podem ser detetados através da alteração no índice de refração, por absorção no UV/visível, usando o detetor de fotodíodos ou um comprimento de onda adequado para os compostos em análise (Soeiro, 2009). De notar que os compostos em estudo E2 e EE2 se caracterizam pela sua baixa polaridade, o que permite que estes sejam removidos da coluna na passagem dos eluentes apropriados (Barreiros *et al.*, 2016)



Figura 4.5 À esquerda, o HPLC (1) juntamente com o detetor de fotodíodos (2) e os respetivos eluentes (3). À direita, a coluna cromatográfica utilizada. Fonte: (Fotografias da autora).

Por forma a alcançar limites de deteção menores, a preparação da amostra, a montante, deverá basear-se em métodos de extração, tais como, *SBSE*, extração em fase sólida (*SPE*), ou micro-extração em fase sólida (*SPME*) (Huang *et al.*, 2008). Almeida e Nogueira (2006), usaram o método de extração através de *SBSE* seguido pelo método analítico de cromatografia líquida de alta *performance* com deteção através de um detetor de fotodíodos, por forma a verificar a presença de diversas hormonas esteroides em água e em matrizes de urina. Os resultados foram aceitáveis, mas salientaram o demoroso tempo de extração associado ao procedimento. Pérez e Escandar (2014) utilizaram igualmente a cromatografia líquida seguida de um detetor de fotodíodos juntamente com uma metodologia quimiométrica de resolução multivariada de curvas de mínimos quadrados alternantes (*MCR-ALS*), permitindo limites de deteção entre 3 a 13 ng/L, excelente precisão e com menos desperdícios laboratoriais tóxicos para o ambiente.

5. Plano Experimental

Para dar cumprimento aos objetivos preconizados pelo presente trabalho, foi definido um Plano Experimental onde se resumem os procedimentos dos ensaios realizados.

Tabela 5.1 Resumo do procedimento experimental.

Ensaio	Concentração de fármaco testada (µg/L)	Caudal diário (L/dia)	Matriz	Volume de amostra (mL)	Compostos estudados	Método de extração	Método analítico
1	100	14	Efluente doméstico tratado simulado	250	E2, EE2	SBSE-PDMS	HPLC-DAD
2	100	14	Efluente doméstico tratado simulado	250	E2, EE2	SBSE-PDMS	HPLC-DAD

Por forma a avaliar a eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2, com o recurso a uma instalação piloto de discos biológicos, foram realizados 2 ensaios, com uma duração total de 6 semanas.

Tabela 5.2 Plano experimental detalhado.

Etapa	Fase	Objetivo
Ensaio Preliminares	Otimização do método	<ul style="list-style-type: none"> Preparações de padrões com a utilização de SBSE, numa amostra de 250 mL de água desmineralizada e com concentrações de 200,100, 50 e 25 µg/L de E2 e EE2 em triplicado. Avaliação da retenção dos compostos nas etapas de filtração. Preparações de padrões com a utilização de SBSE, numa amostra de 250 ml de Metanol e com concentrações de 200,100 e 50 µg/L de E2 e EE2, em triplicado. Preparações de padrões sem a utilização de SBSE, através da injeção direta dos compostos a concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 µg/L, em triplicado. Avaliação da fotodegradação dos compostos E2 e EE2.
Ensaio 1	1.1 Crescimento do biofilme	Avaliação do crescimento do biofilme para uma concentração de 125 mg O ₂ /L.
	1.2 Estudo da remoção dos fármacos E2 e EE2	Avaliação da eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2 através do método de extração SBSE.
Ensaio 2	2.1 Crescimento do biofilme	Avaliação do crescimento do biofilme para uma concentração de 125 mg O ₂ /L.
	2.2 Estudo da remoção dos fármacos E2 e EE2	Avaliação da eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2 através do método de extração SBSE.

As 6 semanas de ensaio, foram dedicadas não só ao objetivo principal, mas também à elaboração de testes por forma a aperfeiçoar o procedimento analítico. Parâmetros como a Carência Química de Oxigénio (CQO), os Sólidos Suspensos Totais (SST), os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e os Sólidos Suspensos Não Voláteis (SSNV) foram controlados ao longo dos dois ensaios. Na Figura 5.1. mostra-se o cronograma geral dos ensaios.

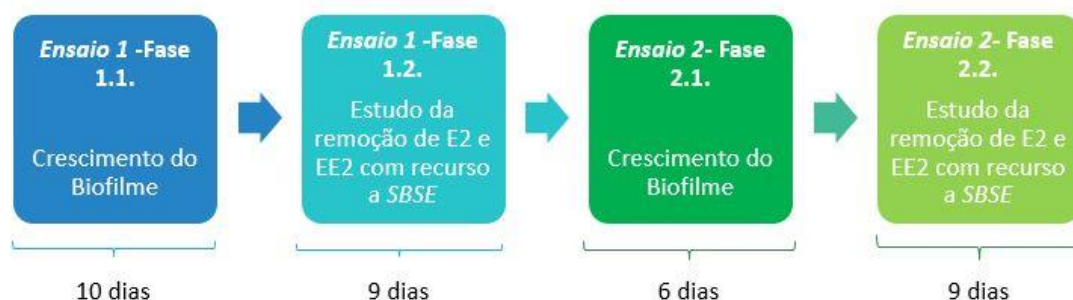


Figura 5.1 Cronograma dos ensaios.

6. Materiais e Métodos

6.1. Instalação Piloto

O diagrama apresentado na Figura 6.1 representa toda a instalação piloto para a remoção dos compostos 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol, constituída por um reator de discos biológicos. A instalação incluiu os seguintes equipamentos:

- a) Sistema de alimentação de substrato e de recolha de efluente, com o seguinte equipamento:
 - Um reservatório de armazenamento da solução de alimentação com capacidade de 25 litros, instalado num frigorífico, marca “*Sharp*”, (Japão);
 - Uma bomba peristáltica de débito variável, marca *Watson Marlow*
 - Um reservatório para recolha de descarga da instalação com capacidade de 25 litros.
- b) Reatores de discos biológicos
 - Funcionamento dos discos através de motor-redutor, marca “*Oriental Motor*” (Japão) 5IK60GS – CFE.

Tabela 6.1 Dimensões e características de operação de toda a instalação piloto.

Número de reatores	1
Volume unitário (mL)	900
Número de discos / reator (Teflon)	4
Diâmetro dos discos (cm)	12
Velocidade de rotação dos discos (rpm)	10
Caudal da Bomba (L/h)	0,5
Modo de funcionamento dos reatores	contínuo

De notar que, apesar do caudal da bomba corresponder a 12 L/dia, para a preparação da alimentação consideraram-se 14 L/ dia, de forma a que os discos biológicos nunca ficassem sem alimentação.

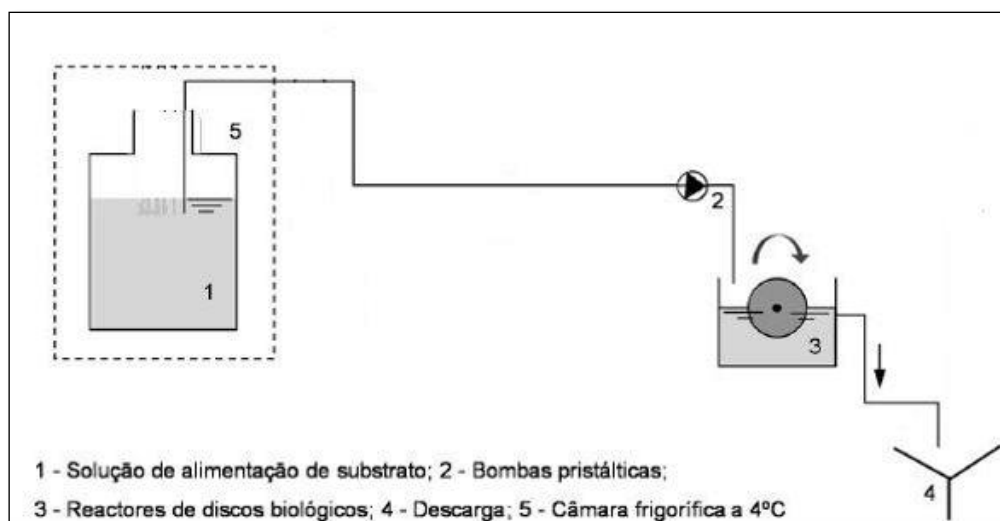


Figura 6.1 Diagrama da instalação piloto (Fonte: Rodrigues, 2009).

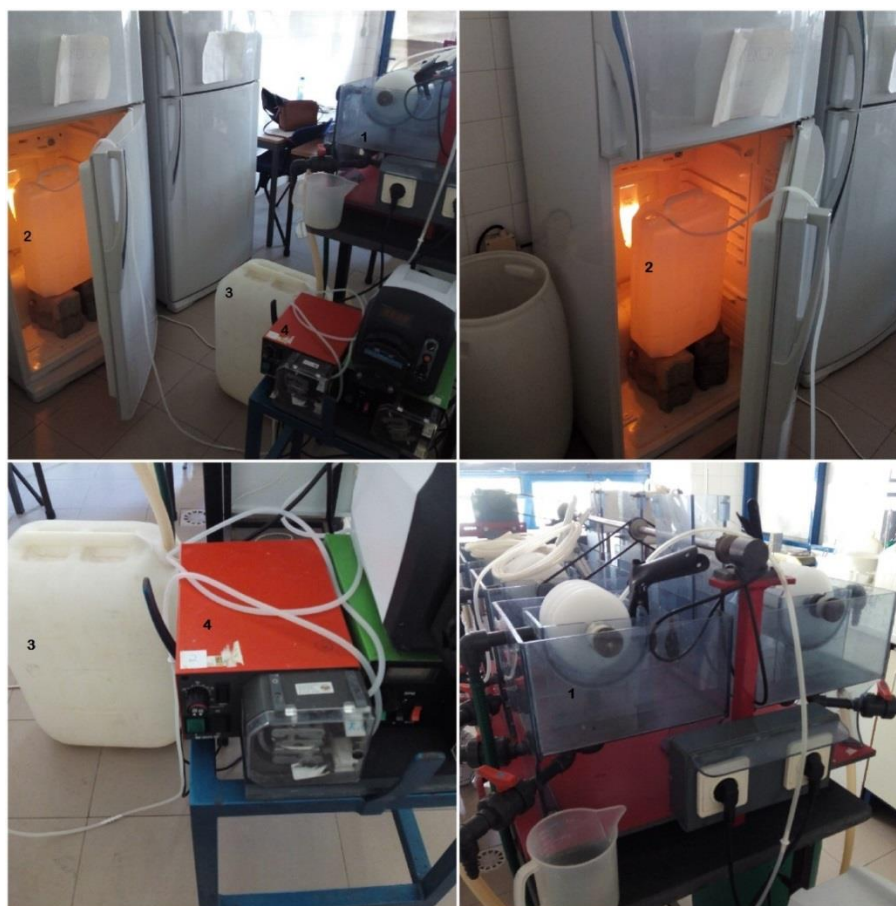


Figura 6.2 Instalação Piloto. 1 - Reator de Discos Biológicos, 2 - Reservatório da solução de alimentação, 3 - Reservatório de descarga, 4 - Bomba peristáltica. Fonte: (Fotografias da autora).

6.2. Material utilizado

Compostos

- 17 β -Estradiol: marca, *Alfa Aesar*, com a referência L03801, com 99% de pureza. Consultar a ficha técnica no Anexo I, para mais detalhes sobre o composto;
- 17 α -Etinilestradiol: marca, *Sigma Aldrich*, com a referência E4876-1G, com \geq 98% de pureza. Consultar a ficha técnica no Anexo II, para mais detalhes sobre o composto.

Barras SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)

- Marca Gerstel Twister, tipo GC 011555-001-00, espessura do filme de 1 mm e comprimento da barra de 20 mm;

Sistema de HPLC

- Cromatógrafo, marca *Waters Alliance*, modelo 2690 de bomba quaternária;
- Detetor *photodiode array*, marca *Waters*, modelo 996;
- Pré-coluna C18, marca *Phenomenex*, KJ0-4282;
- Coluna *Luna 5 μ m C18 (2) 100 Å*, referência (OOF-4252-YO), tamanho LC Column 150 x 3 mm;
- Software *MassLynx V4.0*.

Reagentes

- Acetonitrilo (CH_3CN), marca *Carlo Erba-Heagenis*, MW(g/mol) 41,05; CAS n.º 75-05-8;
- Metanol (CH_3OH), marca *Carlo Erba-Heagenis*, MW(g/mol) 32; CAS n.º 67-56-1;
- Ácido Fórmico (HCOOH) 98% PA-ACS, marca *Panreac*, MW(g/mol) 46,03; CAS n.º 64-18-6;
- Dimetilsulfóxido, DMSO (CH_3SOCH_3), marca *Carlo Erba-Heagenis*, MW(g/mol) 78,13, CAS n.º 67-68-5.

Sistema de filtração a vácuo

- Bomba de vácuo, marca *Millipore Waters*, tipo DOA-V130-BN, com uma pressão de 1200 bar;
- Filtros de microfibras de vidro, marca *Filter-Lab*, porosidade 1,2 μ m, diâmetro 47 mm, referência MFV3;

- Filtros de papel, marca *Macherey-Nagel*, porosidade 0,4 μm , diâmetro 45 mm, referência MN GF-5;
- Filtros marca *Millipore Waters*, porosidade 0,22 μm , diâmetro 47 mm, tipo GV.

Balanças

- *Kern 470-36*, Max 2000 g, Min 0,5 g, d=0,01 g, e=0,1 g;
- *Mettler Toledo AG 204*, Max 210 g, d=0,1 mg.

Equipamento para medição de pH

- Potenciômetro, marca *WTW series InoLab*, modelo *pH/ON 735*.

Outros

- Acrodisc LC 13 - PVDF, marca Gelman, porosidade de 0,2 μm ;
- Três agitadores magnéticos, marca *J.P. Selecta*, tipo *Agitamatic-N*;
- Sistema de fluxo de azoto alimentado por uma garrafa marca *Alphagaz*, modelo AL 12530, pressão a 15°C: 200 bar \pm 5%;
- Equipamento de ultrassons, marca *Julabo*, tipo USR 3/2; frequência 35 kHz;
- Sistema de aquecimento em banho de água, marca *SBS*;
- Vortex, marca *Fisher Bioblock Scientific*, modelo Top-Mix 11118;
- Micropipeta, marca *Autoclavable*, modelo BioPette Plus; (20-200 μL).

6.3. Biofilme

O crescimento do biofilme foi garantido através da adição de uma solução de alimentação sintética, com o objetivo de simular as características do efluente tratado de uma ETAR. O objetivo foi o desenvolvimento do biofilme até ao estado próximo do estacionário, garantindo uma estrutura estável. Após atingir o crescimento pretendido, adicionou-se a solução com a mistura dos dois compostos juntamente com a solução de alimentação.

Efluente Doméstico Simulado

A composição do efluente doméstico simulado adotada, baseou-se numa solução para uma CQO de 8000 mg O_2/L , apresentada na Tabela 6.2 (Domingos, 1999).

Segundo o Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de junho, é definido como requisito para descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas um valor de carência química de oxigénio (CQO) de 125 mg/L de O_2 (Ministério do Ambiente, 1997). Assim,

de forma a simular um efluente proveniente do tratamento terciário, foi preparada uma solução que correspondesse ao valor de CQO legislado.

A solução foi preparada num balão de 1000 mL com água desmineralizada, por forma a permitir tomas diárias de 125 mL (correspondendo a 125 mg O₂/L), para uma duração de 8 dias. Assim, a concentração do balão da solução mãe de alimentação é de 14000 mg/L. A conservação da alimentação foi garantida através de refrigeração.

Tabela 6.2 Composição do efluente doméstico simulado.

Compostos	Unidade	Para CQO 8000 mg O ₂ /L	Para CQO 125 mg O ₂ /L
Glucose	g/L	5,0	8,75
Peptona		1,0	1,75
Extrato de levedura		0,5	0,875
KH ₂ PO ₄		0,8	1,4
(NH ₄) ₂ SO ₄		1,5	2,625
MgSO ₄ .7 H ₂ O		0,200	0,35
CaCl ₂ . 2 H ₂ O		0,020	0,035
FeCl ₃ . 6 H ₂ O		0,001	0,00175
MnSO ₄ . 5 H ₂ O		0,010	0,0175

Na Figura 6.3 é apresentado, esquematicamente, os procedimentos inerentes à preparação da alimentação diária dos reatores de discos biológicos.



Figura 6.3 Esquema dos procedimentos para a preparação da alimentação diária.
Fonte: (Fernandes, 2016; Vicente, 2016).



Figura 6.4 Solução de alimentação (Fonte: Fotografia da autora).

Solução de 17 β -Estradiol e 17 α -Etinilestradiol

Para a preparação da solução mista de 17 β -Estradiol (C₁₈H₂₄O₂) e 17 α -Etinilestradiol (C₂₀H₂₄O₂), utilizou-se um balão de 10 mL, solubilizando em Metanol 14 mg de 17 β -Estradiol e 14 mg de 17 α -Etinilestradiol. A concentração do balão da solução mãe dos fármacos foi de 1400 mg/L e as tomas foram de 1 mL/dia a diluir em 14 L/dia. A conservação da solução foi garantida através de refrigeração a 4° C, contudo antes da utilização foi necessário garantir que a solução fica à temperatura ambiente.

Contribuição do Metanol para a Carência Química de Oxigênio

De forma a garantir que a solução de alimentação juntamente com a solução mista de E2 e EE2 cumpre com o limite de CQO preconizado (125 mg O₂/L) foi necessário calcular o contributo para a CQO de cada uma das substâncias

Os cálculos para a elaboração do procedimento adotado para a preparação da solução de alimentação que simula um efluente doméstico, permitem que a toma diária corresponda às necessidades de CQO. A toma diária de 125 mL da solução corresponde a 125 mg O₂/L.

Contudo, a solução mista dos compostos, preparada com Metanol, exigiu outras considerações. Tendo em conta que a preparação foi feita num balão de 10 mL e que a densidade do metanol é de 0,8 kg/L, o peso de metanol na solução é de 8 g.

Através de uma relação estequiométrica adotada do *Anaerobic Sewage Treatment* (Haandel & Lettinga, 1994), apresentada na Tabela 6.3, foi possível quantificar a quantidade de CQO introduzida na solução pelos diferentes compostos que a constituem, utilizando a seguinte expressão:

$$mgCQO/mgC_xH_yO_z = \frac{8 \times (4x + y - 2z)}{(12x + y + 16z)}$$

Tabela 6.3 Contribuição de cada composto para a CQO.

Composto	x	y	z	mg CQO/mg C _x H _y O _z
17β-Estradiol (C ₁₈ H ₂₄ O ₂)	18	24	2	2,7
17α-Etinilestradiol (C ₂₀ H ₂₄ O ₂)	20	24	2	2,7
Metanol (CH ₃ OH)	1	4	1	1,5

A informação que a Tabela 6.4 permite quantificar a concentração da CQO no balão da preparação da solução mista. Considerando que se retirou 1 mL desta solução para alimentação dos reatores, concluiu-se que a contribuição para a CQO desta toma diária foi de 86 mgO₂/L. Assim, para que no somatório de contribuição das duas soluções o resultado fosse aproximadamente 125 mgO₂/L, à toma de 1 mL da solução mista dos compostos adicionaram-se 40 mL da solução de efluente simulado.

Tabela 6.4 Cálculos para estimar a contribuição em CQO da toma diária da solução mista dos compostos E2 e EE2.

Composto	mg de composto	Fator de Conversão	mg CQO/ mg de composto	Concentração do balão de 10 mL (mg CQO/L)
17β-Estradiol (C ₁₈ H ₂₄ O ₂)	14	2,7	37,8	1207572
17α-Etinilestradiol (C ₂₀ H ₂₄ O ₂)	14	2,7	37,8	
Metanol (CH ₃ OH)	8000	1,5	12000	
Total	-	-	12075,6	

6.4. Método laboratorial adotado

O método adotado para o estudo da remoção dos compostos E2 e EE2 foi a extração sortiva em barra de agitação (SBSE), otimizado e definido por *Vicente* (2016) e *Fernandes* (2016). O método analítico utilizado foi a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e o detetor foi *diode array* (DAD).

Procedimento 1

1. Recolha de 250 mL de amostra para um *Erlenmeyer*;
2. Filtração da amostra:
 - i. Filtro de 1,2 μm ;
 - ii. Filtro de 0,22 μm ;
3. Adição de 25 g de NaCl aos 250 ml de amostra (proporção 100 g/L);
4. Mergulhar a barra SBSE na amostra preparada;
5. Envolver o *Erlenmeyer* com amostra em plástico preto;
 - i. Extração:
 - a) Duração da agitação: 3 h;
 - b) Velocidade de rotação: 900 rpm;
 - ii. Dessorção:
 - a) Extração barra SBSE para 3 mL de CH_3CN ;
 - b) Duração da agitação: 30 min;
 - Velocidade de rotação: 300 rpm;
 - c) Aquecimento em banho de água:
 - Duração: 10 min;
 - Temperatura do banho: 60 °C
 - d) Amostra sujeita a ultrassons;
 - Duração: 5 min;
6. Remoção da barra SBSE da solução sonicada
 - i. Lavagem e condicionamento da barra SBSE:
 - a) Solvente: 3 mL de DMSO;
 - Duração da lavagem: 1 h;
 - Velocidade de rotação: 100 rpm;
 - b) Solvente: 3 mL CH_3CN ;
 - Duração da lavagem: aproximadamente 12 h;
 - Velocidade de rotação: 100 rpm;
7. Filtração da amostra através de *acrodiscs* de 0,2 μm ;
8. Concentração até à secura da solução sonicada sob fluxo de azoto;
9. Retoma em 0,2 mL de CH_3OH ;
10. Injeção em HPLC-DAD:
 - i. Modo de operação isocrático:
 - a) Fluxo: 0,5 mL/min;
 - b) Eluentes:
 - 50% de Acetonitrilo (0,25 mL/min)

- 50% de água ultra pura com ácido fórmico (0,25 mL/min):
 - 99% de água ultra pura Milli-Q;
 - 0,1% Ácido fórmico.
- c) Volume de amostra injetado: 20 µL;
- d) Tempo de corrida: 10 min.

Procedimento 2

1. Recolha de 250 mL de amostra para um *Erlenmeyer*;
2. Filtração da amostra:
 - i. Filtro de 0,4 µm;
3. Adição de 25 g de NaCl aos 250 mL de amostra (proporção 100 g/L);
4. Mergulhar a barra SBSE na amostra preparada;
5. Envolver o *Erlenmeyer* com amostra em plástico preto;
 - i. Extração:
 - a) Duração da agitação: 3 h;
 - b) Velocidade de rotação: 900 rpm;
 - ii. Dessorção:
 - a) Extração barra SBSE para 3 mL de CH₃CN;
 - b) Duração da agitação: 30 min;
 - Velocidade de rotação: 300 rpm;
 - c) Aquecimento em banho de água:
 - Duração: 10 min;
 - Temperatura do banho: 60 °C
 - d) Amostra sujeita a ultrassons;
 - Duração: 5 min
6. Remoção da barra SBSE da solução sonicada
 - i. Lavagem e condicionamento da barra SBSE:
 - a) Solvente: 3 mL de DMSO;
 - Duração da lavagem: 1 h;
 - Velocidade de rotação: 100 rpm;
 - b) Solvente: 3 mL CH₃CN;
 - Duração da lavagem: aproximadamente 12 h;
 - Velocidade de rotação: 100 rpm;
7. Concentração até à secura da solução sonicada sob fluxo de azoto;
8. Retoma em 0,2 mL de CH₃OH;
9. Injeção em HPLC-DAD:
 - i. Modo de operação isocrático:

- a) Fluxo: 0,5 mL/min;
- b) Eluentes:
 - 50% de Acetonitrilo (0,25 mL/min)
 - 50% de água ultrapura com ácido fórmico (0,25 mL/min):
 - 99% de água ultrapura Milli-Q;
 - 0,1% Ácido Fórmico.
- c) Volume de amostra injetado: 20 µL;
- d) Tempo de corrida: 10 min.

6.5. Parâmetros de Controle

De forma a garantir o estado próximo do estacionário do biofilme no reator, realizaram-se diariamente ensaios laboratoriais para determinar a CQO dos reatores e os SST, os SSV e os SSNV.

6.5.1. Determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO)

A determinação da CQO realizada na fração solúvel das amostras, foi efetuada pelo método de refluxo aberto (International Organization for Standardization, 1989; Sawyer & McCarty, 1978).

A fração solúvel das amostras foi obtida, através de uma filtração rápida, utilizando-se filtros de papel, marca *Macherey-Nagel*, referência MNGF-5, com 45 mm de diâmetro e uma porosidade de 0,4 µm.

A amostra foi preparada em tubos de digestão fechados, e mantida em refluxo a aproximadamente 150°C, durante duas horas, numa mistura contendo:

- 10 mL de amostra;
- 5 mL de dicromato de potássio;
- 15 mL de ácido sulfúrico com sulfato de prata.

Para a digestão utilizou-se um aparelho de marca “G. Vittadini Recod/6”. Após a digestão, procedeu-se à determinação da concentração da solução de sulfato de ferro (II) e amônio (c) através da titulação de uma solução contendo:

- 10 mL de dicromato de potássio;
- 100 mL de ácido sulfúrico (4 mol/L)
- 3 gotas de ferroína (indicador)

O ponto de viragem foi determinado pela observação da mudança de cor na amostra, passando de cinzento-azulado para castanho-avermelhado.

A concentração da solução de sulfato de ferro (II) e amónio é dada pela seguinte expressão:

$$c \text{ (mol/L)} = \frac{10 \times 0,04 \times 6}{V} = \frac{2,4}{V}$$

Onde:

- **V** corresponde ao volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido na titulação.

Em simultâneo, realizaram-se ensaios de branco, utilizando o mesmo modo operativo, substituindo o volume destinado à amostra por água destilada.

Para determinar a CQO (mg O₂/L), recorreu-se à seguinte expressão:

$$CQO \left(\frac{mg O_2}{L} \right) = \frac{8000 \times c \times (V_1 - V_2)}{V_0}$$

Onde:

- **c** corresponde à concentração de solução de sulfato de ferro (II) e amónio calculada;
- **V₁**, o volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio em branco;
- **V₂**, o volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio com a amostra;
- **V₀**, o volume (mL) da toma da amostra para o ensaio antes da diluição.

6.5.2. Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Suspensos não Voláteis (SSNV)

A técnica utilizada para a determinação dos SST, SSV e SSNV foi retirada do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Water Works Association, 1992) e do *Chemistry for Environmental Engineering* (Sawyer & McCarty, 1978).

Para determinar os SST, recorre-se à filtração da amostra para uma cápsula de cerâmica com um filtro de microfibras de vidro da marca Filter-Lab, tipo MFV3, com 47 mm de diâmetro e uma porosidade de 1,2 µm. Para tal é necessário:

- 50 mL de amostra;
- Sistema de filtração a vácuo.

Posteriormente procedeu-se à secagem do filtro com recurso a uma estufa a 103°C – 105°C, durante uma a duas horas. O aumento de peso no filtro corresponde aos SST presentes no volume de amostra filtrada. Assim, os sólidos suspensos totais foram obtidos através da seguinte expressão:

$$SST (mg/L) = \frac{(B - A)}{V_{amostra}} \times 10^6$$

Onde:

- **B** é o peso da cápsula de porcelana com um filtro de microfibra de vidro após sair da estufa (g);
- **A** é peso da cápsula de porcelana com o filtro de microfibra de vidro (g).

De seguida, a cápsula é introduzida na mufla, e sujeita a uma temperatura de 550°C, durante 1 hora. Este procedimento permite calcular os SSV através da seguinte expressão:

$$SSV (mg/L) = \frac{(B - C)}{V_{amostra}} \times 10^6$$

Onde **C** é o peso (g) da cápsula de porcelana após sair da mufla.

Os SSNV foram calculados através da seguinte expressão:

$$SSNV (mg/L) = \frac{(C - A)}{V_{amostra}} \times 10^6$$

6.5.3. pH

O pH foi medido através do equipamento dedicado para o efeito, potenciómetro, uma vez por ensaio.

6.6. Ensaaios preliminares

No que respeita á otimização dos procedimentos para o estudo da remoção dos compostos, os testes, designadamente, a adsorção do E2 e EE2 aos materiais da instalação piloto, o teste do volume de amostra (mL) a diferentes concentrações de entrada (µg/L), a quantidade de cloreto de sódio adicionado, a duração de agitação para adsorção (horas) e respetiva velocidade de rotação (rpm), o processo de dessorção, o volume de retoma de amostra (mL) e o processo de lavagem e condicionamento da barra não foram concretizados na presente dissertação uma vez que foram concebidos e otimizados, nas mesmas condições experimentais por *Fernandes (2016)* e *Vicente (2016)*

- Fotodegradação dos compostos E2 e EE2

Este ensaio teve como objetivo testar o potencial de fotodegradação dos compostos em solução mista. Para tal, prepararam-se dois balões de 20 mL com a uma concentração de 500 µg/L em metanol. Um dos balões foi guardado num local completamente isento de luz, e o outro balão foi colocado num local com iluminação natural, como é apresentado na Figura 6.5. O ensaio teve a duração de 5 dias.

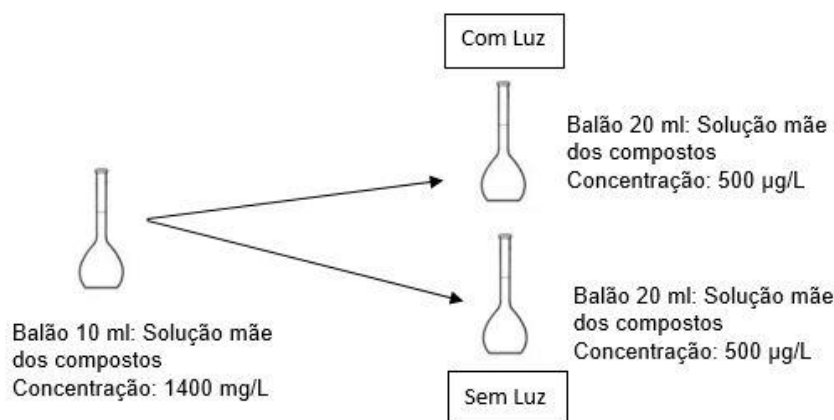


Figura 6.5 Procedimento experimental para a preparação do ensaio de fotodegradação.

- Testes de adsorção dos compostos E2 e EE2 nas etapas de filtração sem o recurso ao método de extração SBSE

1. *Teste de filtração a diferentes tipos de água com uma concentração de E2 e EE2 de 200 µg/L.*

O objetivo deste teste foi avaliar se, para diferentes matrizes, os compostos estariam a adsorver aos filtros utilizados no procedimento experimental. Uma vez que ambos os compostos têm coeficientes octanol/água elevados, a sua adsorção aos filtros poderia ocorrer, alterando as concentrações presentes e consequentemente as leituras dos cromatogramas. A Figura 6.6 apresenta de forma sumária a preparação das diferentes amostras para teste.

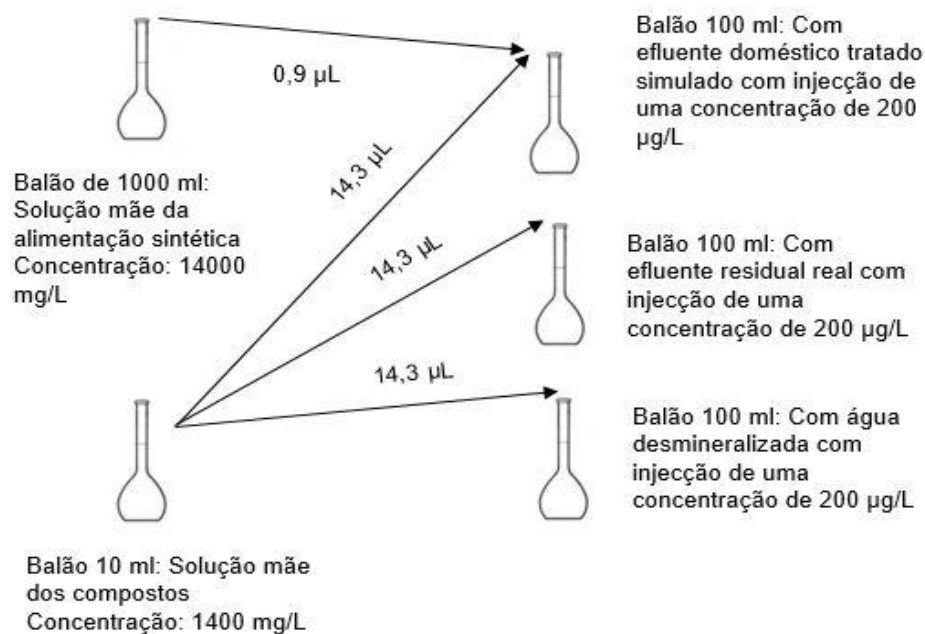


Figura 6.6 Esquema da preparação das amostras para teste.

Após a preparação dos diferentes balões de 100 mL, estes foram filtrados com um filtro de 0,4 µm. Dos filtrados de cada balão, 200 µL passaram no *acrodisc* e posteriormente injetados no *insert* para o *HPLC*, os outros 200 µL foram diretamente para os *inserts* do *HPLC*.

2. Teste de filtração com um padrão direto de 200 µL

A preparação deste teste decorreu como já exemplificado na Figura 6.7. Após a preparação da amostra retiraram-se 200 µL que passaram no *acrodisc* para posteriormente serem injetados no *insert* para o *HPLC* e retiraram-se outros 200 µL que foram diretamente para os *inserts* do *HPLC*.

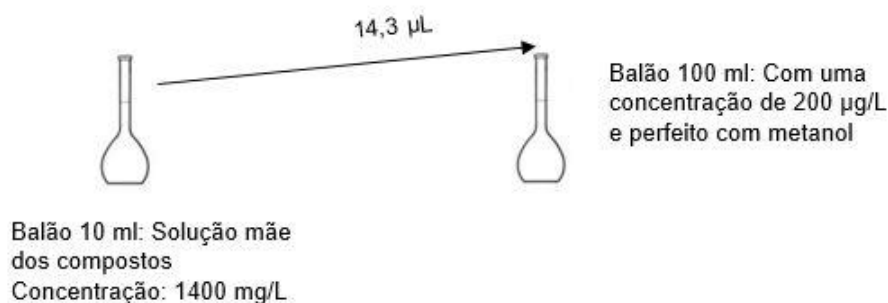


Figura 6.7 Procedimento experimental para o teste de filtração direto.

- Curva de calibração em metanol com recurso ao método de extracção SBSE

Uma vez que ambos os compostos são solúveis em meios alcoólicos, o objetivo deste teste foi perceber se numa matriz de metanol, que facilita a dissolução dos compostos, qual seria a capacidade da barra de extração de concentrar os compostos. O procedimento de preparação dos padrões é apresentado na Figura 6.8 e o procedimento experimental adotado é o descrito no ponto 6.4, procedimento 2. De notar que, na etapa de preparação da amostra de 250 mL, não se adicionou cloreto de sódio, uma vez que este não se dissolve em metanol. Os padrões foram preparados em triplicado.

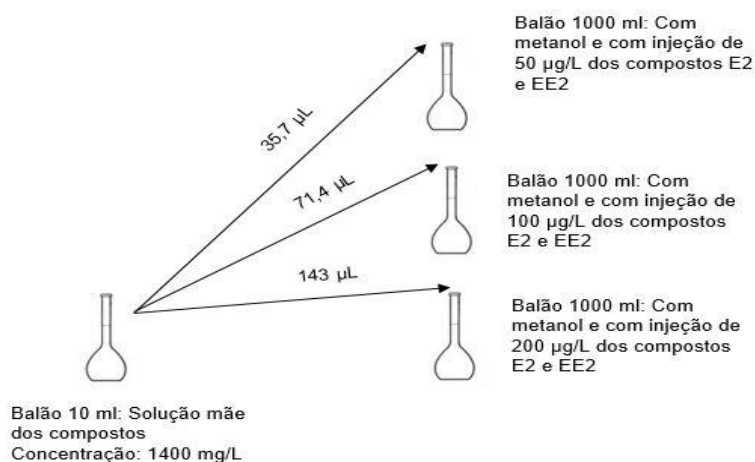


Figura 6.8 Procedimento experimental para preparação da curva de calibração em matriz alcoólica.

- Curva de calibração sem recurso ao método de extração SBSE

O presente teste teve como objetivo elaborar uma curva de calibração com padrões em metanol diretos, sem a utilização das SBSE, com concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 µg/L. A Figura 6.9 apresenta o esquema do procedimento de preparação dos padrões. Posteriormente à preparação, retiraram-se 200 µL de cada balão para injeção nos *inserts*, para leitura no HPLC. Os padrões foram preparados em duplicado.

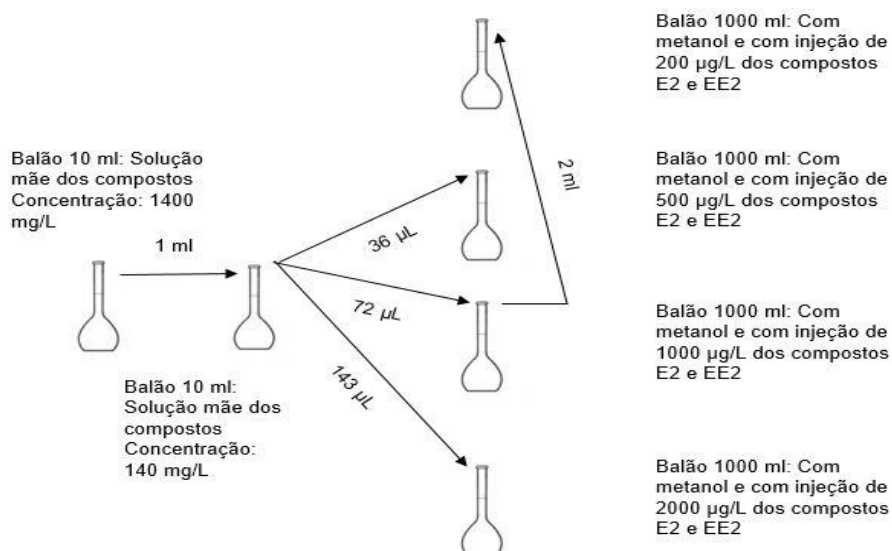


Figura 6.9 Esquema do procedimento experimental para a preparação dos padrões diretos dos compostos E2 e EE2.

6.7. Curva de Calibração para quantificação das amostras

Os padrões mistos com os compostos E2 e EE2, foram preparados em triplicado, para concentrações de 25 µg/L 50 µg/L 100 µg/L e 200 µg/L, como é exemplificado na Figura 6.10.

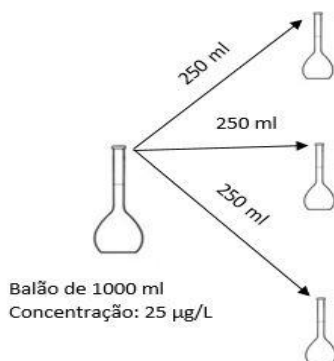


Figura 6.10 Exemplificação da preparação do padrão 25 µg/L.

Para efeitos de quantificação dos cromatogramas resultantes, foi considerado o comprimento de onda de 281 nm, nos tempos de retenção 4,4 min e 5,5 min para os compostos E2 e EE2, respetivamente.

6.8. Limite de Detecção e Limite de Quantificação com a coluna Luna 5µm C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO)

Para determinar o limite de deteção (*LOD*) e o limite de quantificação (*LOQ*) recorreu-se ao método de determinação através de brancos, adaptado de *Shrivastava e Gupta* (2011). Assim os valores de *LOD* e *LOQ* para cada um dos compostos foram determinados de acordo com as seguintes expressões:

$$LOD (\mu g/L) = X_{b1} + (3 \times S_{b1})$$

$$LOQ (\mu g/L) = X_{b1} + (10 \times S_{b1})$$

Onde:

- X_{b1} é a média das concentrações ($\mu g/L$) dos brancos obtidas nos tempos de retenção de cada composto;
- S_{b1} é o desvio padrão das concentrações de todos os brancos.

6.9. Método de quantificação dos compostos E2 e EE2

Após concluir todo o procedimento experimental de extração, a determinação dos compostos E2 e EE2 fez-se de acordo com a seguinte ordem:

1. Análise do cromatograma no comprimento de onda 281 nm;
2. Identificação do pico dos diferentes compostos através do respetivo tempo de retenção e espetro;
3. Quantificação das áreas dos respetivos picos;
4. Determinação da concentração dos compostos E2 e EE2 através das equações da reta obtidas pelas curvas de calibração descritas no ponto 6.7;

$$Concentração\ E2\ (\mu g/L) = \frac{Área\ do\ Pico + 35,225}{2,0135}$$

$$Concentração\ EE2\ (\mu g/L) = \frac{Área\ do\ Pico + 62,739}{3,1572}$$

7. Resultados

7.1. Parâmetros de controlo

Ensaio 1

- **CQO**

Na Tabela 7.1 mostram-se valores diários da CQO determinados à saída do reator. Apenas se fez uma determinação de CQO da alimentação de forma a confirmar o valor que se pretendia introduzir, aproximadamente 125 mg O₂/L.

Tabela 7.1 Valores de CQO na fase de crescimento do biofilme do Ensaio 1.

Fase	Data	CQO médio à saída do reator (mg O₂/L)
Crescimento de biofilme	22-Jun	-
	23-Jun	23,0
	27-Jun	136,5
	28-Jun	18,6
	29-Jun	27,4
	30-Jun	4,5



Figura 7.1 Fase de crescimento de biofilme do Ensaio 1. A fotografia do canto superior esquerdo representa uma fase mais inicial, e a imagem do canto inferior direito a fase final do crescimento antes da adição dos compostos a testar. Fonte: (Fotografias da autora).

Para controlo do crescimento do biofilme alimentado com uma solução contendo: 40 mgO₂/L de solução de alimentação sintética e 86 mg O₂/L de solução em metanol com E2 e EE2, fizeram-se medições diárias do CQO.

Tabela 7.2 Valores de CQO para controlo durante a remoção dos compostos E2 e EE2.

<i>Fase</i>	<i>Dia</i>	<i>Data</i>	<i>CQO médio à saída do reator (mg O₂/L)</i>	<i>Eficiência de remoção de CQO (%)</i>
Remoção dos compostos E2 e EE2	0	01-Jul		
	1	02-Jul	50,8	59,4
	2	03-Jul	23,0	81,6
	3	04-Jul	18,2	85,4
	4	05-Jul	31,8	74,5
	5	06-Jul	50,3	59,8
	6	07-Jul	9,1	92,7
	7	08-Jul	18,0	85,6
	8	09-Jul	27,0	78,4

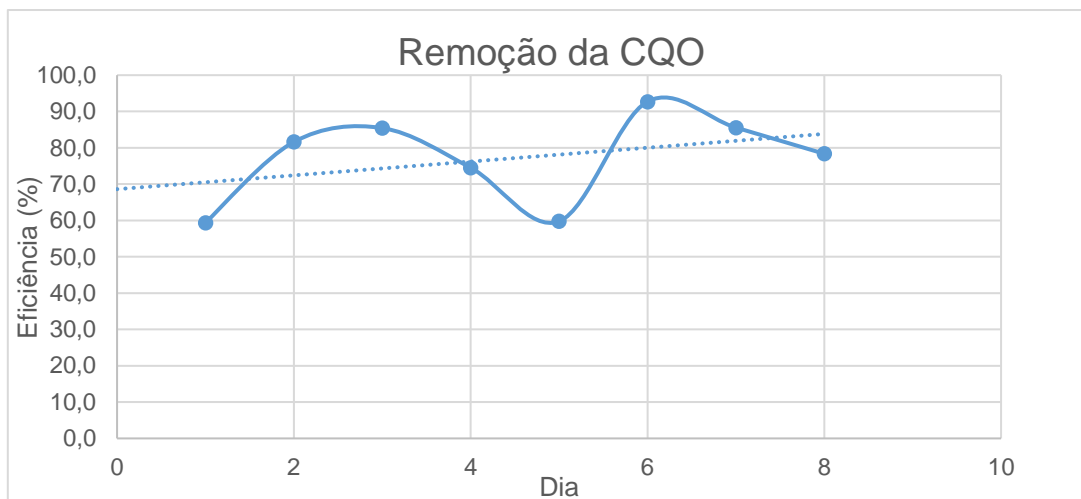


Figura 7.2 Eficiência de remoção da CQO na fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 1.

A Figura 7.3 demonstra o desenvolvimento do biofilme ao longo da fase de remoção dos compostos E2 e EE2.

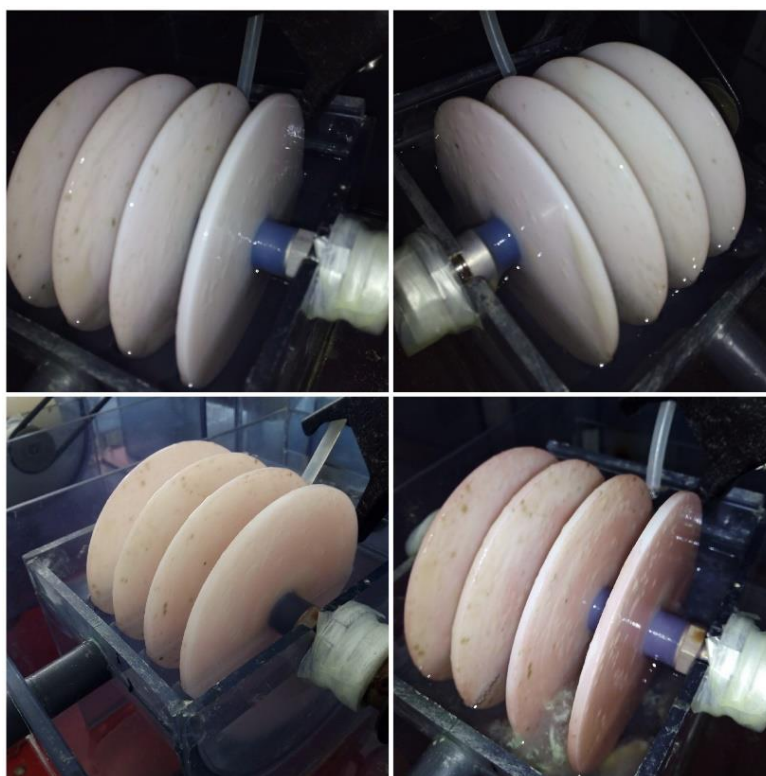


Figura 7.3 Fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 1. A imagem no canto superior esquerdo refere-se ao início da fase de remoção dos compostos no ensaio 1 e a imagem do canto inferior direito representa o fim do ensaio 1. Fonte: (Fotografias da autora).

- **SST, SSV e SSNV**

Tabela 7.3 Valores de SST, SSV e SSNV no ensaio 1.

Fase	Dia	Data	Sólidos Totais, SST (mg/L)	Sólidos Totais Voláteis, SSV (mg/L)	Sólidos Totais não Voláteis, SSNV (mg/L)
Crescimento de biofilme	-	22-Jun	18	18	0
	-		16	16	0
	-	27-Jun	104	88	16
Remoção dos compostos E2 e EE2	2	3-Jul	4	0	4
	3	4-Jul	12	12	0
	4	5-Jul	22	16	6
	5	6-Jul	42	42	0
	6	7-Jul	50	50	0
	7	8-Jul	4	4	0
	8	9-Jul	4	4	0

- **pH**

O pH da água desmineralizada com solução de alimentação sintética foi de 5,74.

Ensaio 2

- **CQO**

Na Tabela 7.4 encontram-se valores diários da CQO determinados à saída do reator à semelhança do que se descreve para o ensaio 1.

Tabela 7.4 Valores de CQO da solução de alimentação na fase de crescimento do biofilme do Ensaio 2.

Fase	Data	CQO médio à saída do reator (mg O₂/L)
Crescimento de biofilme	13-Jul	-
	14-Jul	55,4
	18-Jul	73,5

Tal como no ensaio 1, na Figura 7.4 mostra-se o crescimento do biofilme.



Figura 7.4 Fase de crescimento do biofilme do Ensaio 2. A fotografia da esquerda representa uma fase mais inicial, e a da direita a fase final do crescimento antes da adição dos compostos a testar. Fonte: (Fotografias da autora).

Com o mesmo objetivo descrito no ensaio 1, na Tabela 7.5 mostram-se os valores diários de CQO, à saída do reator, para controlo do crescimento do biofilme alimentado com uma solução contendo: 40 mg O₂/L de solução de alimentação sintética e 86 mg O₂/L de solução em metanol com E2 e EE2.

Tabela 7.5 Valores de CQO para controlo durante a remoção dos compostos E2 e EE2.

Fase	Dia	Data	CQO médio à saída do reator (mg O₂/L)	Eficiência de remoção de CQO (%)
Remoção dos compostos E2 e EE2	0	19-Jul	-	
	1	20-Jul	54,3	56,5
	2	21-Jul	40,6	67,5
	3	22-Jul	50,8	59,4
	4	23-Jul	55,4	55,7
	5	24-Jul	28,1	77,5
	6	25-Jul	41,5	66,8
	7	26-Jul	49,8	60,2
	8	27-Jul	32,0	74,4

A Figura 7.5 descreve a variação da eficiência de remoção da CQO ao longo da fase de remoção dos compostos E2 e EE2.

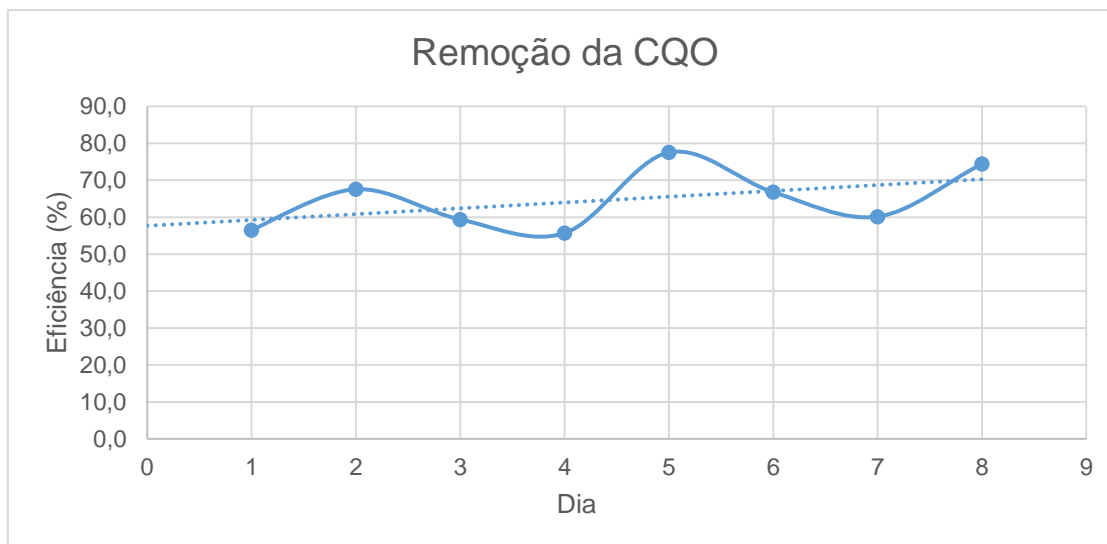


Figura 7.5 Eficiência de remoção da CQO na fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 2.

Na Figura 7.6 mostra-se o crescimento do biofilme ao longo da fase de remoção dos compostos E2 e EE2.



Figura 7.6 Fase de remoção dos compostos E2 e EE2 do Ensaio 2. A imagem no canto superior esquerdo refere-se ao início da fase de remoção dos compostos e a imagem do canto inferior direito representa o fim do ensaio 2. Fonte: (Fotografias da autora).

- **SST, SSV e SSNV**

Tabela 7.6 Valores de SST, SSV e SSNV no ensaio 2.

Fase	Dia	Data	Sólidos totais (mg/L) SST	Sólidos Totais Voláteis (mg/L) SSV	Sólidos Totais não Voláteis (mg/L) SSNV
Crescimento do Biofilme	-	18-Jul	70	70	0
Remoção dos compostos E2 e EE2	0	19-Jul	4	4	0
	1	20-Jul	18	18	0
	2	21-Jul	22	22	0
	3	22-Jul	350	318	32
	4	23-Jul	48	38	10
	5	24-Jul	40	24	16
	6	25-Jul	66	66	0
	7	26-Jul	34	34	0
	8	27-Jul	30	30	0

- **pH**

O pH da água desmineralizada com solução de alimentação sintética foi de 5,81.

7.2. Remoção dos compostos E2 e EE2 através de um piloto de discos biológicos

Curvas de Calibração

As Figura 7.7 e Figura 7.8 representam as curvas adotadas para a quantificação das concentrações diárias removidas pelo piloto de discos biológicos. A aplicação das retas resultantes foi descrita no ponto 6.9 do capítulo anterior.

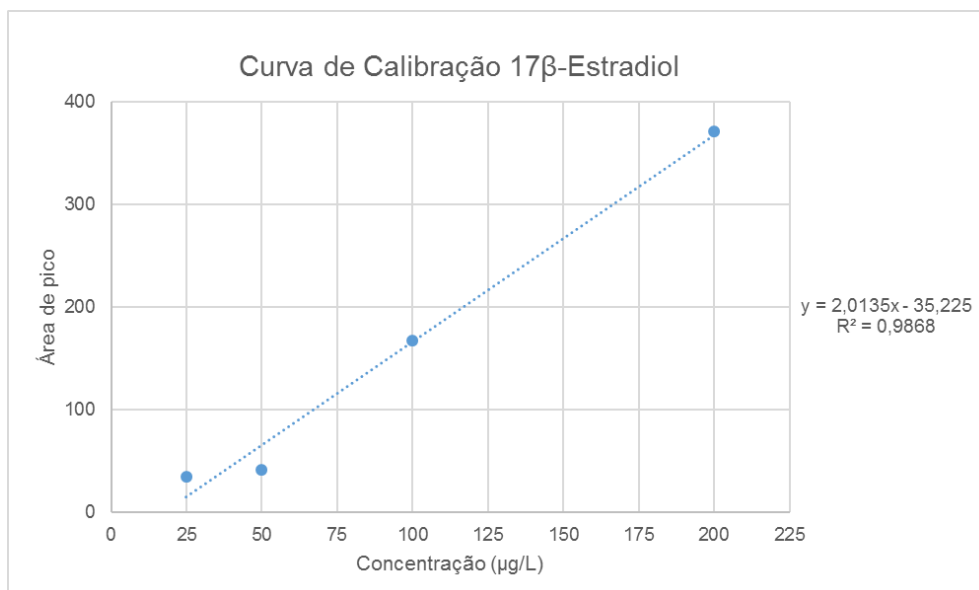


Figura 7.7 Curva de calibração adotada para a quantificação da concentração removida de E2 em ambos os ensaios.

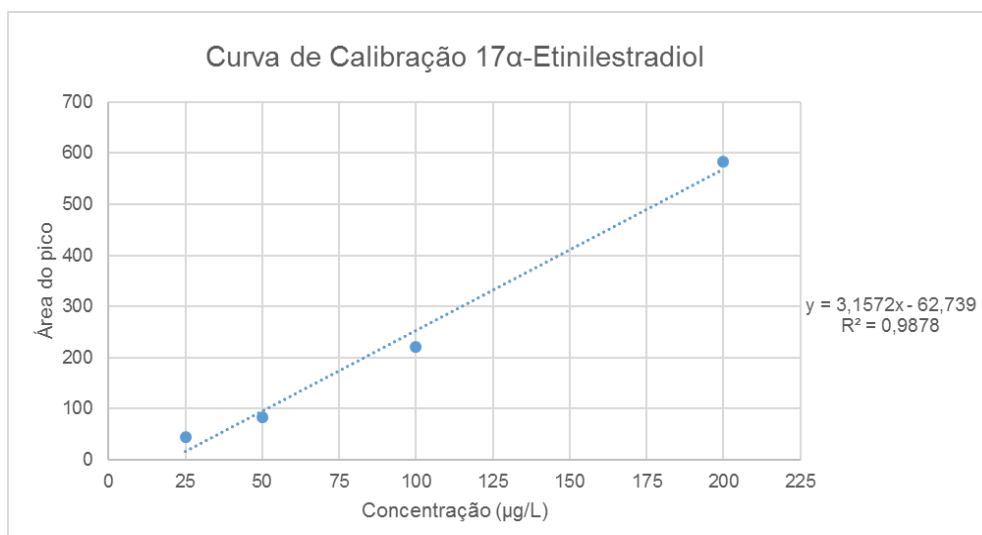


Figura 7.8 Curva de calibração adotada para a quantificação da concentração removida de EE2 em ambos os ensaios.

Para ambas as figuras, o coeficiente de correlação, r^2 , obtido encontra-se próximo de 1. Indicando uma correlação positiva forte entre as concentrações obtidas e a área do pico, onde os valores obtidos não se distanciam da reta da regressão linear obtida.

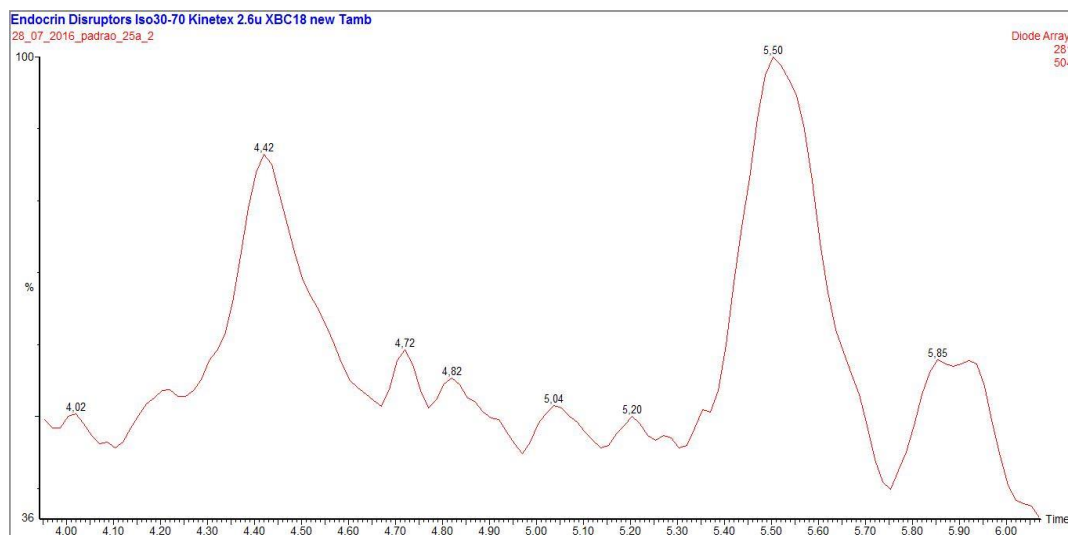


Figura 7.9 Cromatograma da amostra de 25 µg/L. O pico à esquerda representa o composto E2, no tempo de retenção 4,4 min, e o pico à direita representa o composto EE2 no tempo de retenção 5,5 min.

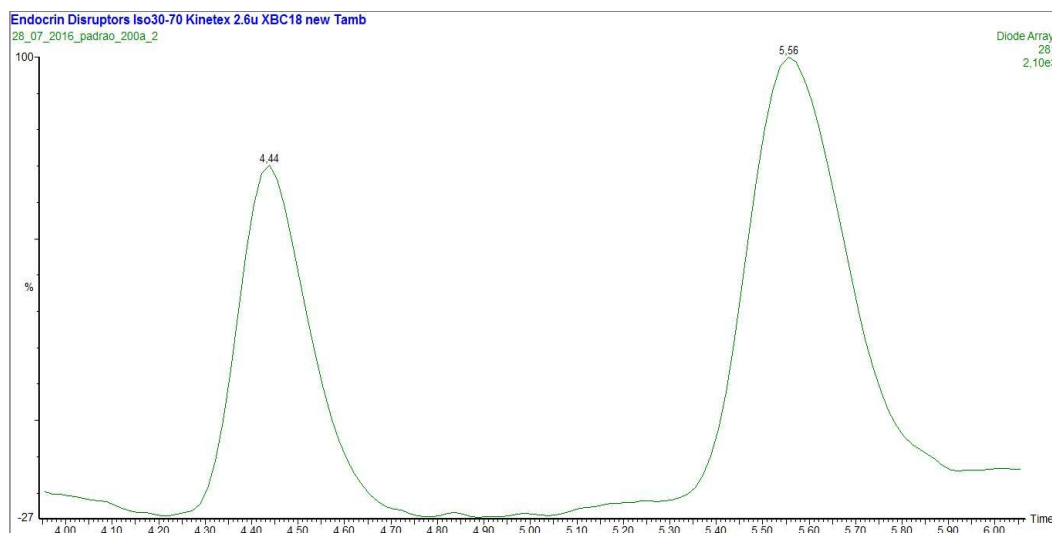


Figura 7.10 Cromatograma da amostra de 200 µg/L. O pico à esquerda representa o composto E2, no tempo de retenção 4,4 min. e o pico à direita representa o composto EE2 no tempo de retenção 5,5 min.

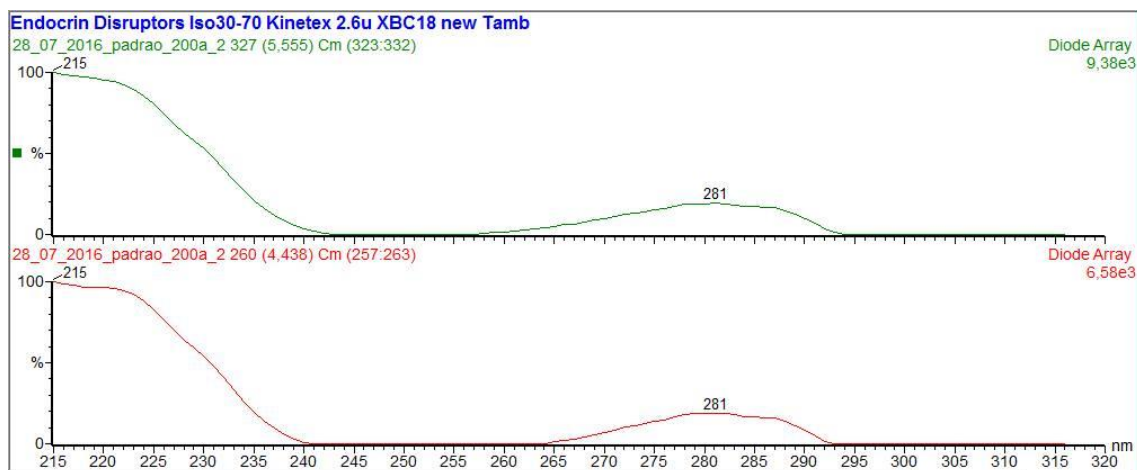


Figura 7.11 Espectros de absorção dos compostos E2 e EE2, ($\lambda = 215\text{-}320\text{ nm}$).

Limites de Detecção e de Quantificação

A aplicação do método descrito no ponto 6.8 do capítulo anterior permitiu alcançar os respectivos valores de limite de detecção (LOD) e de limite de quantificação (LOQ) para os compostos E2 e EE2.

Tabela 7.7 Limites de detecção e quantificação para os compostos em estudo.

	17 β -Estradiol	17 α -Ethinilestradiol
LOD ($\mu\text{g/L}$)	20,6	21,0
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	26,9	23,4

Ensaio 1

- **Eficiência de remoção do composto E2 em discos biológicos.**

A Tabela 7.8 apresenta os valores de concentração diários à saída do reator do composto E2, após a aplicação da respetiva metodologia de quantificação, descrita no ponto 6.9 do capítulo anterior.

Tabela 7.8 Concentrações de E2 removidas diariamente no ensaio 1.

Data	Dia	LOD/ LOQ	Tempo de Retenção (min)	Área	Concentração à saída (µg/L)
1-Jul	0	sim/sim	4,45	165	-
2-Jul	1	sim/sim	4,42	30	32,4
3-Jul	2	sim/sim	4,41	25	29,9
4-Jul	3	sim/sim	4,48	49	41,8
5-Jul	4	sim/sim	4,43	16,8	25,8
6-Jul	5	não/ não	-	-	-
7-Jul	6	sim/sim	4,44	48,48	41,6
8-Jul	7	sim/sim	4,44	37,76	36,2
9-Jul	8	sim/sim	4,42	49,71	42,2

A Figura 7.12 permite compreender a variação de eficiência de remoção no ensaio 1. A eficiência de remoção foi calculada em relação à concentração teórica de entrada, isto é, 100 µg/L.

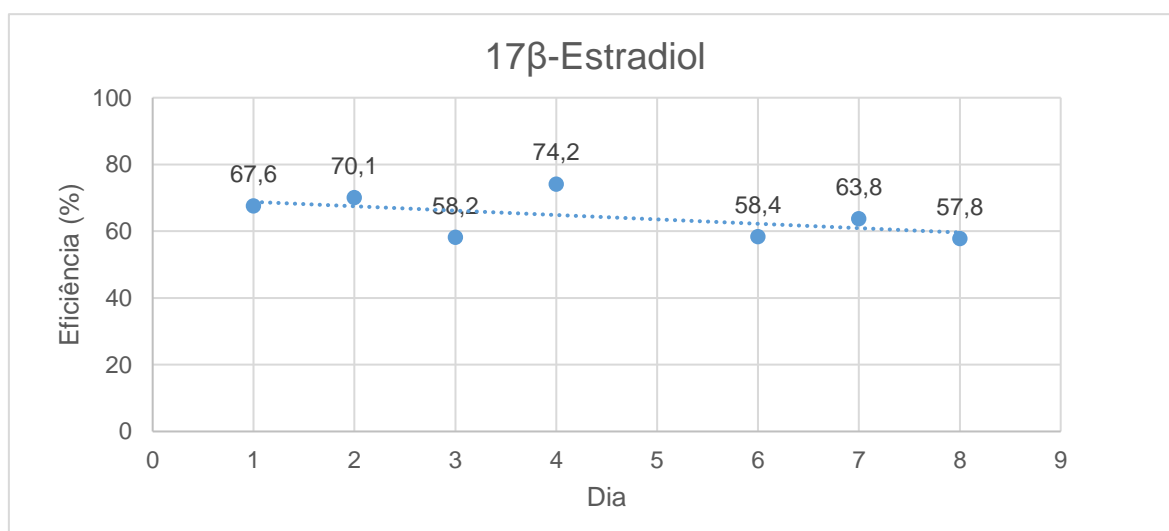


Figura 7.12 Eficiência de remoção do composto E2 no ensaio 1.

- **Eficiência de remoção do composto EE2 em discos biológicos.**

A Tabela 7.9 apresenta os valores de concentração diários à saída do reator do composto EE2, após a aplicação da respectiva metodologia de quantificação, descrita no ponto 6.9 do capítulo anterior.

Tabela 7.9 Concentrações de EE2 removidas diariamente no ensaio 1.

<i>Data</i>	<i>Dia</i>	<i>LOD/ LOQ</i>	<i>Tempo de Retenção (min)</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração de saída (µg/L)</i>
1-Jul	0	sim/sim	5,6	398,0	-
2-Jul	1	sim/sim	5,59	168,0	73,1
3-Jul	2	sim/sim	5,6	209,0	86,1
4-Jul	3	sim/sim	5,69	202,0	83,9
5-Jul	4	sim/sim	5,63	180,0	76,9
6-Jul	5	sim/sim	5,6	58,0	38,2
7-Jul	6	não/não	-	-	-
8-Jul	7	sim/sim	5,59	233,2	93,7
9-Jul	8	sim/sim	5,6	166,5	72,6

A Figura 7.13 permite compreender a variação de eficiência de remoção do composto EE2 no ensaio 1. A eficiência de remoção foi calculada em relação à concentração teórica de entrada, 100 µg/L.

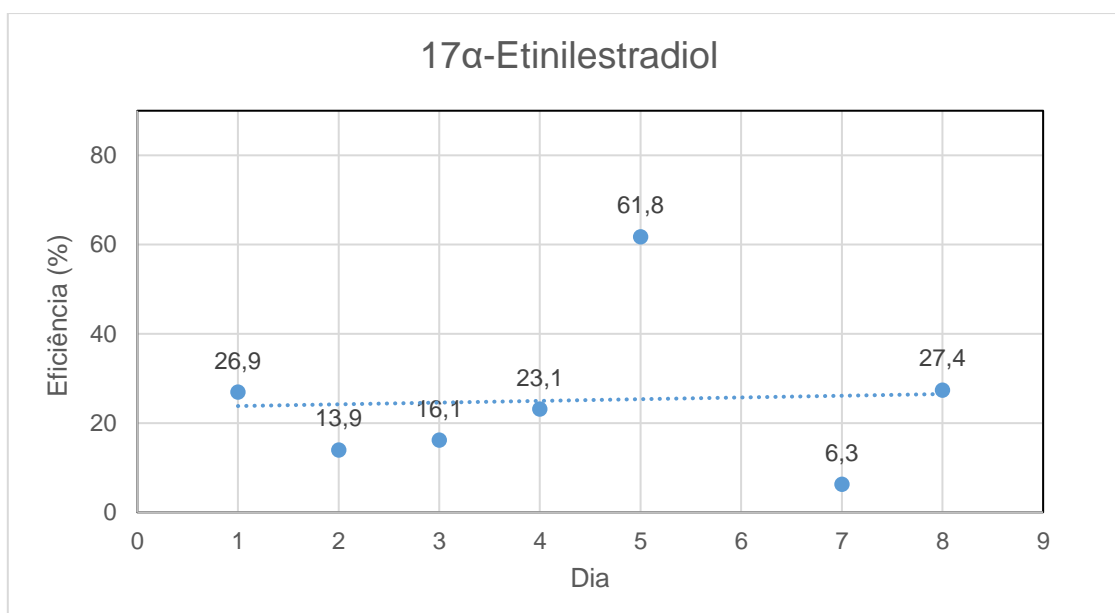


Figura 7.13 Eficiência de remoção do composto EE2 no ensaio 1.

Ensaio 2

- **Eficiência de remoção do composto E2 em discos biológicos.**

Na Tabela 7.10 mostram-se os valores de concentração diários de E2 à saída.

Tabela 7.10 Concentrações de E2 removidas diariamente no ensaio 2.

<i>Data</i>	<i>Dia</i>	<i>Detetável/ Quantificável</i>	<i>Tempo de Retenção (min)</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração à saída (µg/L)</i>
19-Jul	0	sim/sim	4,46	149,81	-
20-Jul	1	não/ não	-	-	-
21-Jul	2	sim/sim	4,45	113,7	74,0
22-Jul	3	não/não	-	-	-
23-Jul	4	sim/sim	4,41	21,45	28,1
24-Jul	5	sim/sim	4,46	24,68	29,8
25-Jul	6	sim/sim	4,45	41,43	38,1
26-Jul	7	sim/sim	4,45	39,67	37,2
27-Jul	8	não/não	-	-	-

A Figura 7.14 permite compreender a variação de eficiência de remoção no ensaio 2. A eficiência de remoção foi calculada em relação à concentração na solução de alimentação, de 100 µg/L.

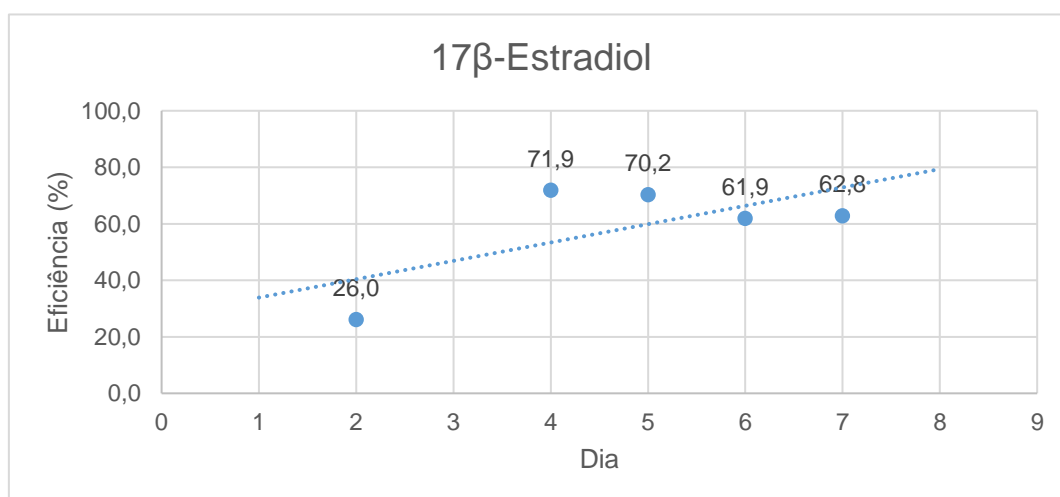


Figura 7.14 Eficiência de remoção do composto E2 no ensaio 2.

- **Eficiência de remoção do composto EE2 em discos biológicos.**

Na Tabela 7.11 mostram-se os valores de concentração diários de EE2 à saída do reator.

Tabela 7.11 Concentrações de EE2 removidas diariamente no ensaio 2.

<i>Data</i>	<i>Dia</i>	<i>Detetável/ Quantificável</i>	<i>Tempo de Retenção (min)</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração de saída (µg/L)</i>
19-Jul	0	sim/sim	5,61	267,2	
20-Jul	1	não/não	-	-	-
21-Jul	2	sim/sim	5,62	199,4	83,0
22-Jul	3	sim/sim	5,61	219,8	89,5
23-Jul	4	sim/sim	5,61	192,9	81,0
24-Jul	5	sim/sim	5,62	179,9	76,9
25-Jul	6	sim/sim	5,63	184,9	78,4
26-Jul	7	sim/sim	5,63	208,1	85,8
27-Jul	8	não/não	-	-	-

A Figura 7.15 permite compreender a variação de eficiência de remoção no ensaio 2. A eficiência de remoção foi calculada em relação à concentração teórica de entrada, 100 µg/L.

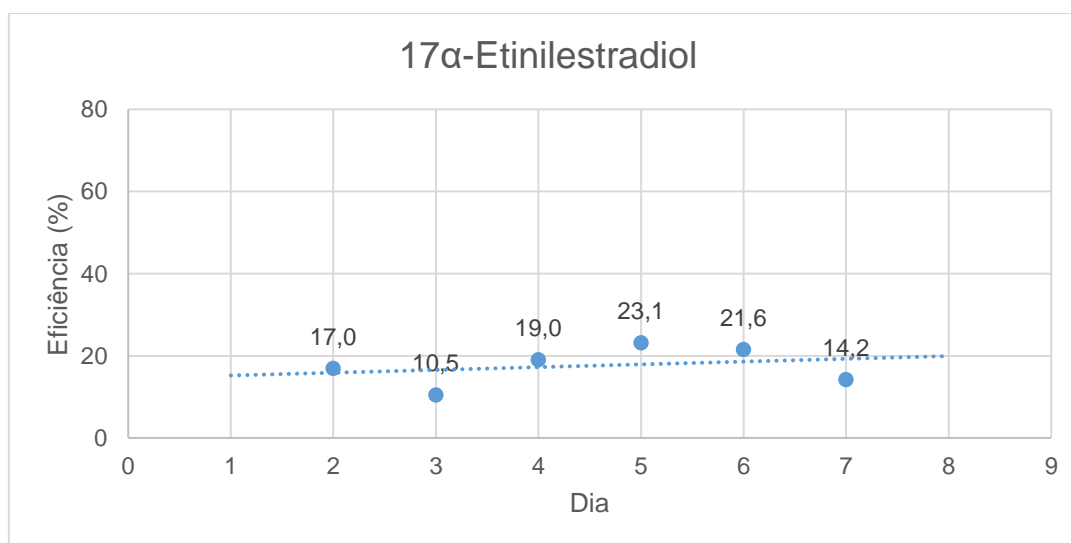


Figura 7.15 Eficiência de remoção do composto EE2 no ensaio 2.

7.3. Ensaio Preliminares

- Comparação das curvas de calibração numa matriz alcoólica com as curvas de calibração numa matriz de água desmineralizada

Na Figura 7.16 mostra-se a curva de calibração obtida para cada um dos compostos numa amostra em metanol com o recurso ao método de extração SBSE.

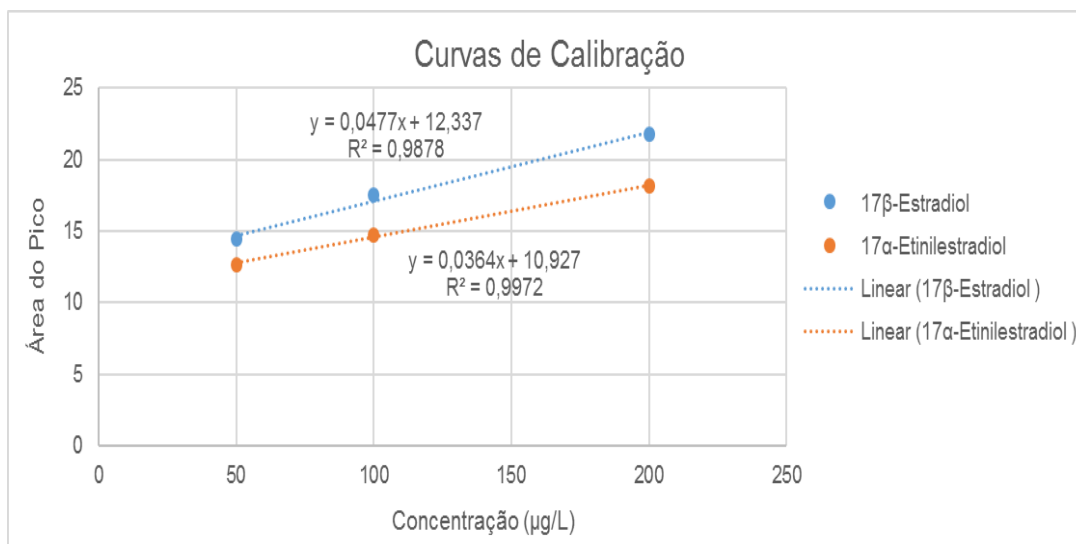


Figura 7.16 Curva de calibração dos compostos E2 e EE2 em metanol com recurso a SBSE.

O objetivo da elaboração das presentes curvas de calibração foi a comparação entre a aptidão da barra num meio aquoso e num meio alcoólico, representado nas Figura 7.17 e Figura 7.18.

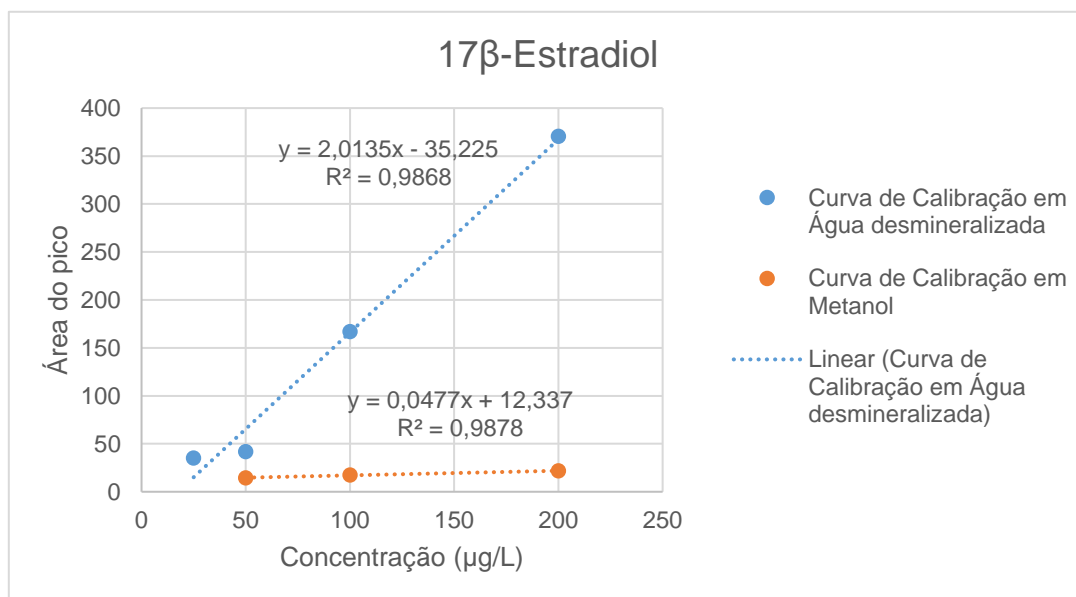


Figura 7.17 Comparação entre a curva de calibração numa amostra em água desmineralizada e a curva de calibração numa amostra em metanol para o composto 17β-Estradiol.

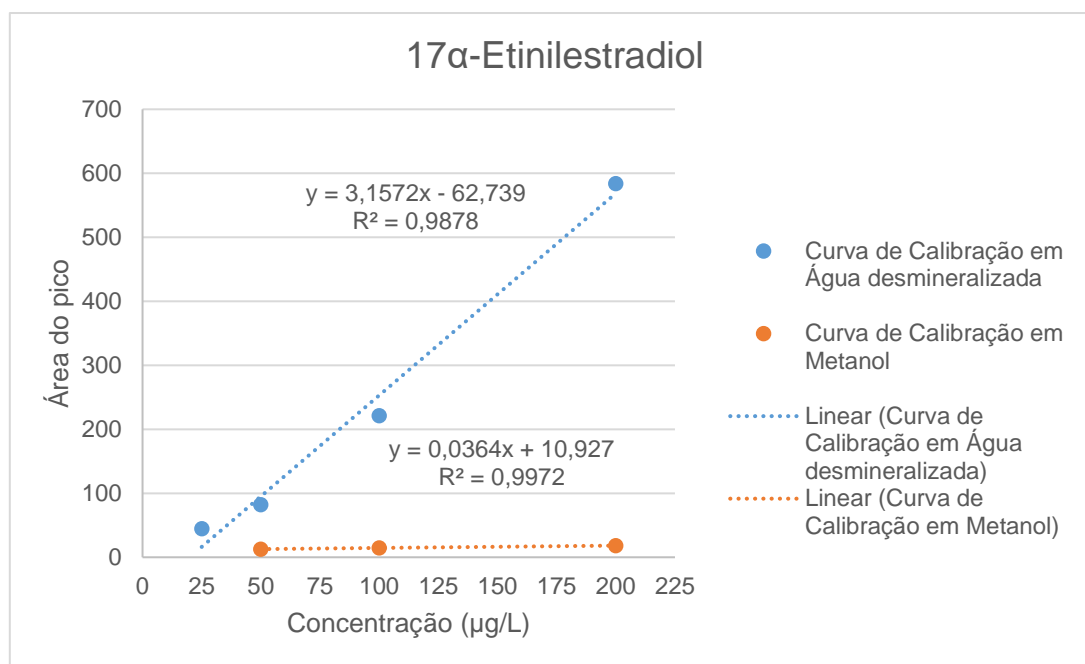


Figura 7.18 Comparação entre a curva de calibração numa amostra em água desmineralizada e a curva de calibração numa amostra em metanol para o composto 17α-Etinilestradiol.

Através da análise das Figura 7.17 e Figura 7.18, constata-se que a capacidade da barra de concentrar os compostos num meio com água desmineralizada é consideravelmente superior à capacidade num meio alcoólico.

- Curva de Calibração sem recurso ao método de extração SBSE

O objetivo da elaboração de curvas de calibração para ambos os compostos em estudo, foi a sua aplicabilidade na quantificação dos testes realizados, descritos desseguida, uma vez que estes foram elaborados sem recurso ao método de extração SBSE.

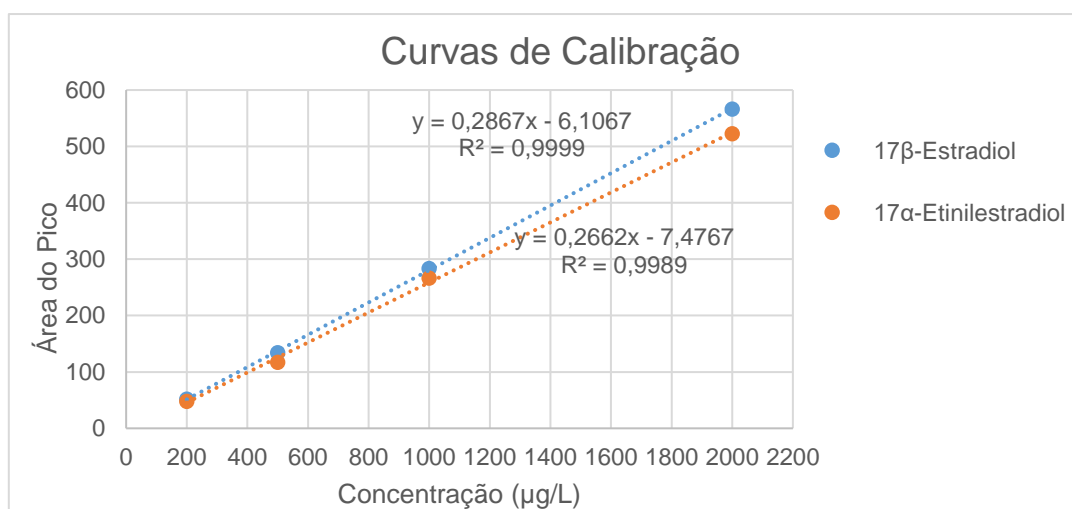


Figura 7.19 Curvas de calibração sem recurso a SBSE para os compostos E2 e EE2.

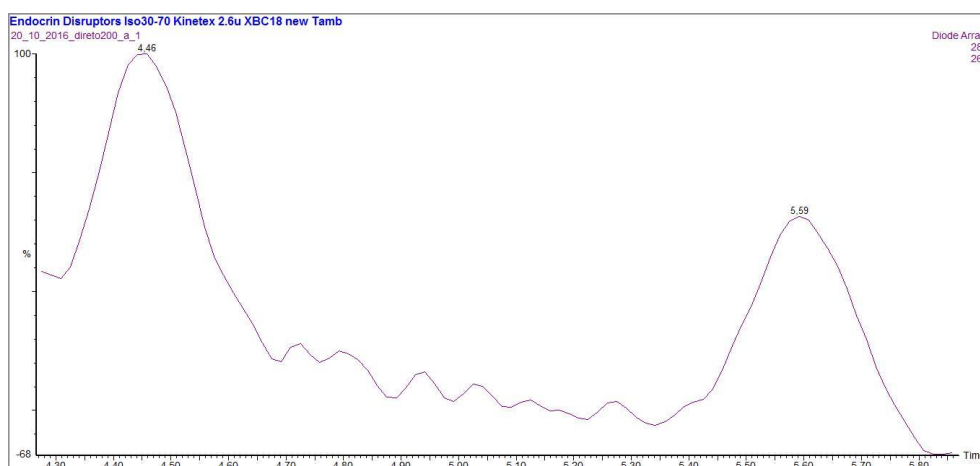


Figura 7.20 Cromatograma da amostra de 200 µg/L sem o recurso a SBSE. O pico à esquerda representa o composto E2, no tempo de retenção 4,4 min. e o pico à direita representa o composto EE2 no tempo de retenção 5,5 min.

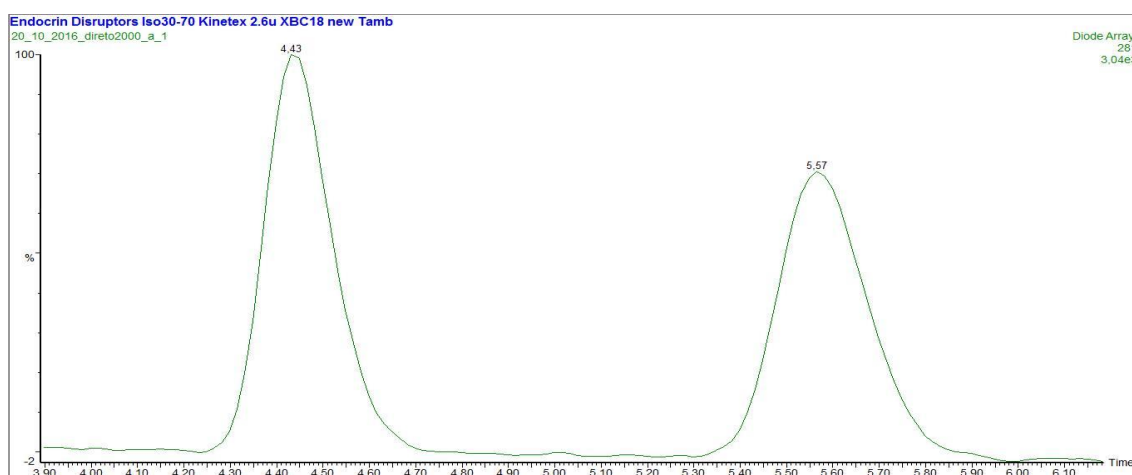


Figura 7.21 Cromatograma da amostra de 2000 µg/L sem o recurso a SBSE. O pico à esquerda representa o composto E2, no tempo de retenção 4,4 min. e o pico à direita representa o composto EE2 no tempo de retenção 5,5 min.

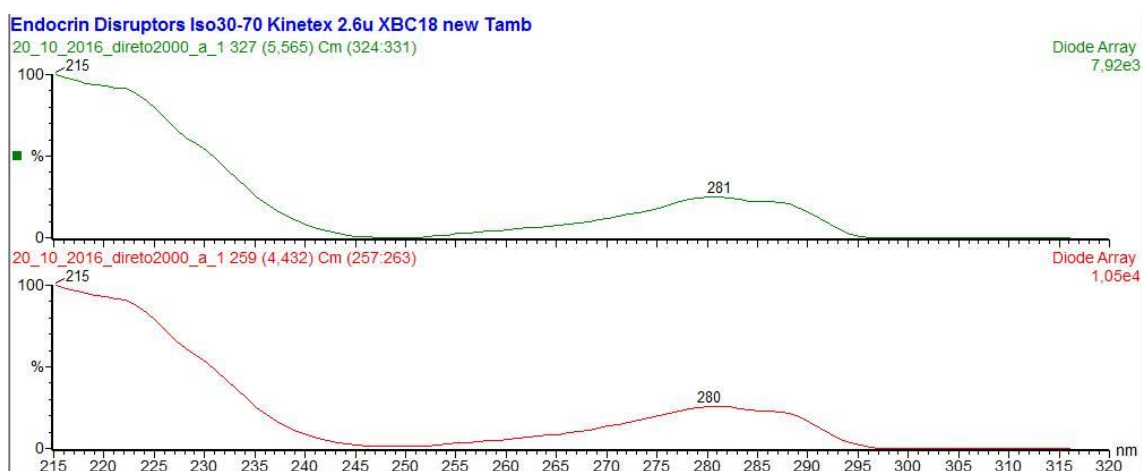


Figura 7.22 Espectro de absorção dos compostos E2 e EE2, ($\lambda = 215\text{-}320\text{ nm}$).

- Fotodegradação dos compostos E2 e EE2

O presente teste teve como objetivo compreender se haveria potencial de degradação dos compostos E2 e EE2 perante a exposição à luz.

Tabela 7.12 Resultados do ensaio de fotodegradação para os compostos E2 e EE2.

Dia	17 β -Estradiol				17 α -Ethinilestradiol			
	Com Luz		Sem Luz		Com Luz		Sem Luz	
	Área	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Área	Conc. ($\mu\text{g/L}$)
0	60	231	91	339	58	246	73	302
1	67	255	126	461	70	291	82	336
2	85	318	72	272	84	344	50	216
3	-	-	102	377	-	-	80	329
4	25	108	65	248	31	145	53	227
5	86	321	63	241	86	351	44	193

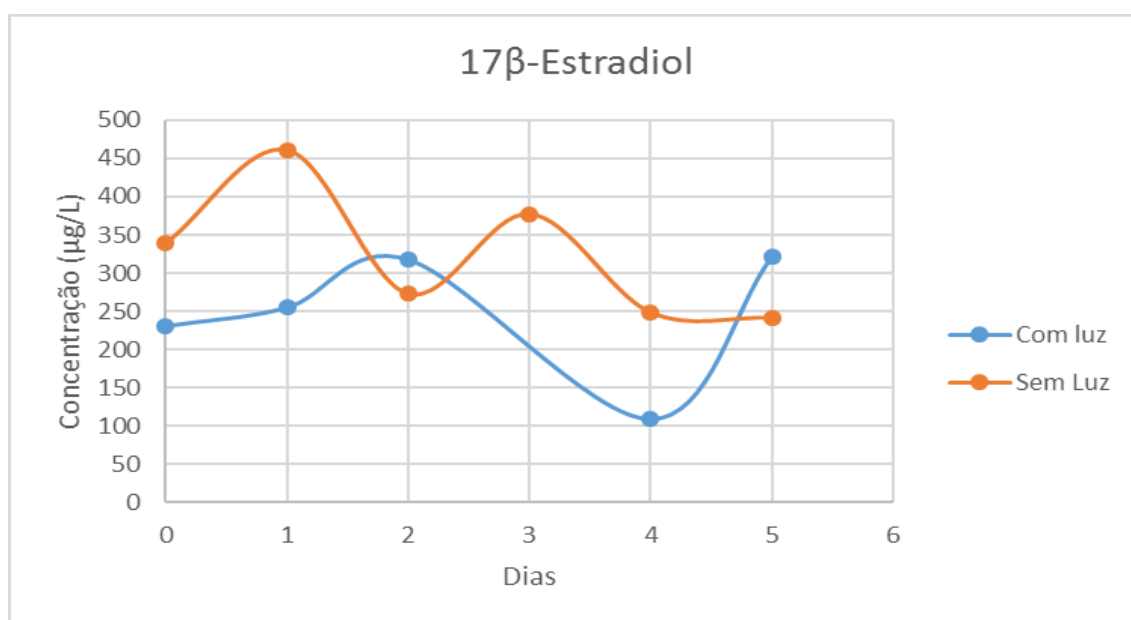


Figura 7.23 Resultados obtidos no teste de fotodegradação do composto E2 ao longo de 5 dias.

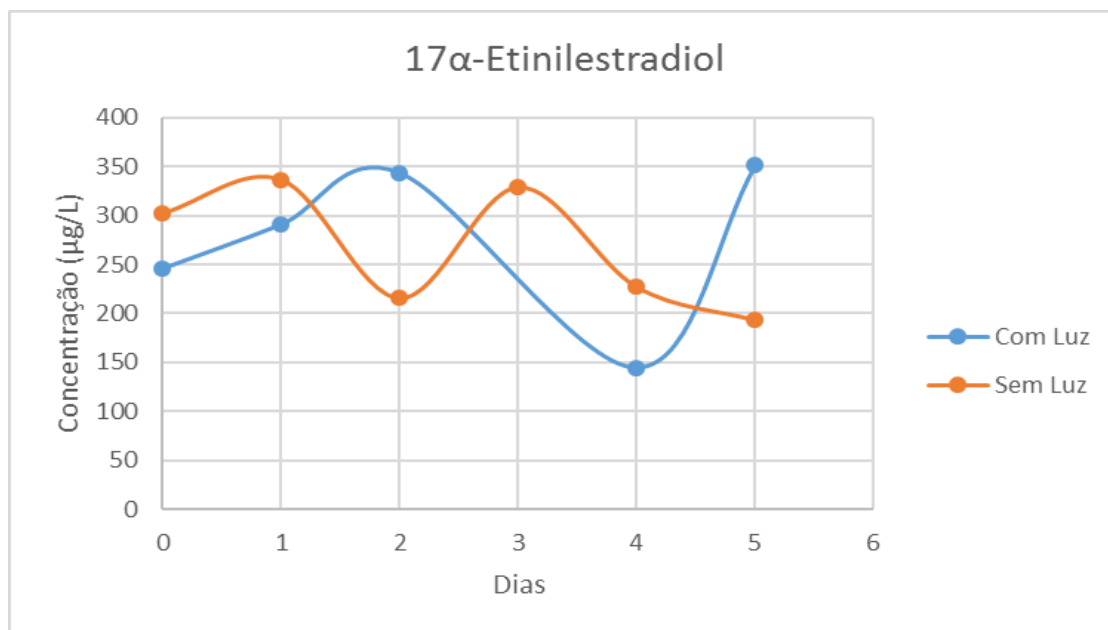


Figura 7.24 Resultados obtidos no teste de fotodegradação do composto EE2 ao longo de 5 dias.

- Testes de adsorção dos compostos E2 e EE2 nas etapas de filtração sem o recurso ao método de extração SBSE

O objetivo da realização deste teste, foi averiguar se existiria alguma percentagem de composto E2 ou EE2 a ficar adsorvida nos filtros, uma vez que estes têm um K_{ow} elevado. A Tabela 7.13 apresenta os resultados obtidos no teste, de notar que para cada tipo de matriz só se elaborou uma réplica.

Tabela 7.13 Resultados do ensaio de teste ao sistema de filtração para os compostos E2 e EE2.

Testes	17β-Estradiol				17α-Etinilestradiol			
	c/ filtro		s/filtro		c/ filtro		s/filtro	
	Área	Conc. (μg/L)	Área	Conc. (μg/L)	Área	Conc. (μg/L)	Área	Conc. (μg/L)
Água desmineralizada e spike de 200 ppb	6,3	43,3	1,0	24,8	2,6	38,0	2,0	35,7
Água residual e spike de 200 ppb	0,6	23,4	n.d.	n.d.	4,6	45,3	n.d.	n.d.
Água residual simulada com spike de 200 ppb	4,2	36,1	2,1	28,7	9,0	61,9	n.d.	n.d.
Padrão 200 ppb	3,1	32,0	11,4	61,1	10,6	67,8	7,5	56,4

8. Discussão de Resultados

De acordo com a descrição no capítulo 4, a monitorização e remoção dos compostos 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2), tem sido uma questão de enorme importância e atenção na comunidade científica. Na presente dissertação pretendeu-se avaliar a eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2 recorrendo a uma instalação piloto de discos biológicos. Com já referido, este trabalho baseou-se no procedimento experimental desenvolvido por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016) e suportou os resultados obtidos na presente dissertação, utilizando o mesmo equipamento.

Nas fases de crescimento do biofilme, em ambos os ensaios, foram monitorizados parâmetros como CQO, SST, SSV e SSNV. Os resultados de CQO obtidos no ponto 7.1, para o ensaio 1 e ensaio 2, revelam-se dentro do expectável, com uma CQO de entrada próxima da CQO teórica pretendida (125 mg O₂/L) e com uma média de saída de 42 mg O₂/L e 64,4 mg O₂/L, respetivamente. Relativamente aos resultados obtidos para os parâmetros SST, SSV e SSNV, para ambos os ensaios, o SST medidos nesta fase representavam maioritariamente o biofilme presente, uma vez que todos os sólidos suspensos totais volatizaram, estando, por isso, os SSNV abaixo do limite de deteção do método. Tanto no ensaio 1 como no ensaio 2, o biofilme não atingiu uma espessura na ordem dos centímetros, contudo, no que se refere à eficiência de remoção de CQO, considerou-se que o objetivo foi cumprido. Para ambos os ensaios o pH não interferiu na experiência uma vez que se manteve abaixo dos valores de pKa de cada um dos compostos, não havendo o risco de remoção de protões dos mesmos.

A fase de crescimento do biofilme, para que se atingisse o estado próximo do estacionário do biofilme, teve durações diferentes para cada ensaio. No ensaio 1, a duração foi de 10 dias, no ensaio 2 foi de 6 dias. A explicação para este facto pode estar na diferença de temperatura ambiente na qual decorreu cada ensaio, também verificado por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016), concluindo que as temperaturas mais elevadas propiciam o desenvolvimento do biofilme. A temperatura média de Lisboa no período de crescimento de biofilme do ensaio 1 foi de 28 °C, no ensaio 2 foi de 33°C (AccuWeather, 2016). Porém, considerou-se que a diferença de temperatura ambiente não interferiu nas conclusões do presente estudo.

Relativamente à fase onde se avaliou a remoção dos compostos E2 e EE2, a CQO média à saída do reator para os ensaios 1 e 2 foi de 28,5 mg O₂/L e 44 mg O₂/L respetivamente. Para os sólidos, os resultados obtidos em cada ensaio na fase de remoção foram semelhantes aos resultados obtidos na fase de crescimento de biofilme,

com valores de SST iguais aos valores de SSV. Relativamente ao desenvolvimento do biofilme, na fase de remoção dos compostos do ensaio 1, o biofilme desenvolveu-se, apresentando uma cor ligeiramente rosada, também verificado nos ensaios desenvolvidos por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016). No ensaio 2, verificou-se igualmente o desenvolvimento de biofilme com cor rosada, contudo mais intensa. Esta característica do biofilme é explicada pela época do ano em que decorreu o ensaio (meses quentes), comprovado por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016) que descreveram exatamente a mesma situação para um período igual, e verificaram que esta cor não se desenvolve nos meses mais frios. Para ambos os ensaios o biofilme apresentou um desenvolvimento “saudável” sem nenhum inconveniente e com biomassa facilmente sedimentável.

Quanto à remoção dos compostos em estudo no ensaio 1, verificou-se que para o 17 β -Estradiol e o 17 α -Ethinilestradiol, obtiveram-se eficiências médias de 64% e de 23% respetivamente. No ensaio 2 obtiveram-se eficiências médias de remoção para o 17 β -Estradiol e o 17 α -Ethinilestradiol de 63% e 18% respetivamente.

Fernandes (2016) obteve eficiências de remoção absolutas para o composto 17 β -Estradiol entre 35% e 88%, e uma média de 66% com um piloto de discos biológicos alimentado com uma solução de CQO 125 mg O₂/L. Na presente dissertação, o máximo de eficiência obtido para este composto no conjunto dos dois ensaios foi de 74,2%, contudo os valores médios obtidos no primeiro e segundo ensaio foram de 64% e 63%, respetivamente.

Vicente (2016) obteve eficiências de remoção absolutas para o composto 17 α -Ethinilestradiol entre 0% e 64% (com maior número de amostras < 50%), e uma média de 37% com um piloto de discos biológicos alimentado com uma solução de CQO 125mg O₂/L. Na presente dissertação, o máximo de eficiência obtido para este composto no conjunto dos dois ensaios foi de 61,8%, contudo os valores médios obtidos no primeiro e segundo ensaio foram de 23% e 18%, respetivamente. Porém, *Vicente* (2016) constatou que para uma solução de alimentação com CQO de 250mgO₂/L, obteve melhores eficiências de remoção do composto, variando de 13% a 70%.

Relativamente à comparação das curvas de calibração, obtidas com o recuso ao método de extração *SBSE*, numa matriz de água desmineralizada e numa matriz de metanol conclui-se que a capacidade de concentração dos compostos é maior na matriz de água desmineralizada, como se mostrou nas Figura 7.17 e Figura 7.18 do ponto 7.3. Segundo *Almeida e Nogueira* (2006), a presença de Metanol torna a matriz menos polar, facilitando a solubilização de compostos mais hidrofóbicos e reduz a afinidade destes

compostos à camada de PDMS da barra de agitação. Tanto o E2 como o EE2, ambos contendo valores de K_{ow} elevados, são bastante solúveis em matrizes alcoólicas, levando-os a permanecer nesta ao invés de se ligarem à camada de PDMS.

Dos resultados obtidos do teste de fotodegradação, não foi possível concluir se existe de fato degradação dos compostos, como se pode verificar nas Figura 7.23 e Figura 7.24 do ponto 7.3. Só se analisou uma amostra para cada tipo de composto, não tendo sido, por isso suficiente para concluir a fotodegradação destes compostos. *Fernandes (2016)* e *Vicente (2016)* realizaram o mesmo tipo de teste e concluíram que não existiu degradação dos compostos.

Relativamente ao teste da adsorção dos compostos às etapas de filtração, apresentado na Tabela 7.13, não se obtiveram resultados conclusivos acerca da adsorção dos compostos ao filtro. Só se analisou uma amostra para cada tipo de matriz, não tendo sido, por isso suficiente. Contudo, a alteração do procedimento experimental do ensaio 1 para o ensaio 2, no que respeita a todas as filtrações a que a amostra é sujeita, levou à conclusão que não se verificaram diferenças nos resultados finais. Apesar de o procedimento 1 se tornar mais complexo uma vez que se inicia com duas filtrações sucessivas de 1,2 e 0,22 μm , e posteriormente a filtração com *acrodisc* de 0,2 μm , antes da evaporação com azoto, este garante a proteção da pré-coluna e da coluna cromatográfica do *HPLC*, tornando importante a sua aplicação. O procedimento 2 foi mais rápido, com apenas uma filtração no início da preparação da amostra com um filtro de 0,4 μm . Mesmo sendo procedimentos de processamento de amostras diferentes, os valores obtidos nas amostras de ambos os ensaios não diferiram. Considera-se que o procedimento 1 deverá ser o adotado, mas apenas porque permite maior conservação do equipamento a jusante.

No capítulo 4, ponto 4.7 foram apresentadas eficiências de remoção de vários tipos de tratamento secundário e de vários tipos de tratamento terciário. Relativamente à remoção de micropoluentes como o E2 e EE2, no tratamento secundário deve-se essencialmente a transformações biológicas e/ou químicas e à sorção dos micropoluentes aos sólidos existentes na massa de água. Contudo, uma vez que o objetivo da presente dissertação foi avaliar a viabilidade de um tratamento terciário utilizando discos biológicos, a comparação deve ser feita relativamente aos tipos de tratamento terciário apresentados.

Na Tabela 4.4 apresentaram-se os tipos de tratamento biológico e tipos de processo avançado de oxidação (AOPs). Relativamente aos tratamentos biológicos, a lagoa de macrófitas apresentou uma eficiência de remoção do E2 de aproximadamente 60%, não

sendo detetável o composto EE2. Os filtros de areia apresentam uma eficiência máxima de remoção para o composto E2 de 20% e para o EE2 de 10%. Relativamente aos AOPs, as eficiências de remoção para ambos os compostos são superiores a 80%. Contudo, como já foi referido nesse mesmo capítulo, os AOPs podem introduzir efeitos negativos através da formação de subprodutos ou produtos de transformação tóxicos (H. sang Kim *et al.*, 2007; Lee & Von Gunten, 2009; Luo *et al.*, 2014; Shappell *et al.*, 2008) e o custo do tratamento de água residual com este tipo de processos não é atualmente economicamente sustentável aquando em escala real (Koh *et al.*, 2008).

Neste sentido, além das vantagens enumeradas no capítulo 4, ponto 4.8, inerentes à utilização de discos biológico, estes apresentam-se como uma possibilidade viável para tratamento terciário, numa etapa de afinação a jusante do tratamento secundário, uma vez que a implantação dos mesmos não introduz uma perda de carga significativa, permitindo a sua integração em ETAR já construídas. A acrescentar, o fato de o seu modo de operação não apresentar risco de introdução de toxicidade, contrariamente aos AOPs, de necessitarem de baixo custo de operação e pouca área de implantação. Relativamente às eficiências de remoção que se obtiveram no presente estudo para a remoção de compostos disruptores endócrinos, fazem deste tipo de tratamento uma opção a ser igualmente equacionada.

9. Conclusões

No seguimento da discussão de resultados do capítulo anterior, as principais conclusões são as seguintes:

- Para ambos os ensaios, o crescimento e desempenho do biofilme não foi afectado pelas condições de afluência, nomeadamente a baixa concentração de carbono (simulação de um efluente urbano após tratamento secundário) e a presença de metanol associado à solução mista dos compostos E2 e EE2.
- O estudo de degradação biológica dos compostos E2 e EE2, decorreu de um modo estável e próximo do regime estacionário, ao longo dos ensaios;
- Comparando com os resultados obtidos por *Fernandes* (2016) e *Vicente* (2016), que avaliaram a eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2 individualmente, admite-se que não existe uma diferença significativa de resultados, quando estes compostos se encontram em solução mista.
- As eficiências de remoção alcançadas para os compostos E2 e EE2 são apresentadas na Tabela 9.1.

Tabela 9.1 Resumo dos resultados obtidos do estudo da eficiência de remoção dos compostos E2 e EE2 utilizando um piloto de discos biológicos.

Ensaio	Composto	Concentração de afluente dos compostos (µg/L)	Eficiência de remoção máxima (%)	Eficiência de remoção mínima (%)	Eficiência de remoção média (%)
1	E2	100	74	58	64
	EE2		62	6	23
2	E2		72	26	63
	EE2		23	11	18

- Os resultados obtidos nos ensaios podem ser considerados satisfatórios face às eficiências apresentadas nos sistemas de tratamento biológico com processos de biomassa fixa e suspensa, nos quais a disponibilidade de nutrientes, concentração de substrato, não foi limitativa.
- Apesar dos compostos serem solúveis em Metanol, o método de extração SBSE não é compatível com essa matriz, sendo que a sua capacidade de concentração dos compostos foi mais elevada em matriz de água, como foi descrito no capítulo de discussão de resultados.

10. Desenvolvimentos Futuros

As conclusões deste estudo permitiram compreender o potencial da utilização de reatores de discos biológicos como tratamento de afinação para remoção de 17 β -Estradiol e 17 α -Ethinilestradiol. Futuros contributos no seguimento da presente dissertação poderão passar por:

- Observação microscópica do biofilme, de forma a identificar os microrganismos que se desenvolvem na presença dos compostos E2 e EE2, analisando a sua evolução ao longo do tempo.
- Controlar melhor a temperatura ambiente a que se encontra a instalação piloto de discos biológicos, de forma a perceber quais as condições ótimas para o desenvolvimento do biofilme, maximizando a sua taxa de crescimento, e avaliando o crescimento de determinadas espécies em deterioramento de outras;
- Avaliar o biofilme, no sentido de compreender se a remoção dos compostos se deve à sorção dos mesmos no biofilme ou se é realmente um processo de biodegradação.
- Avaliar a aplicabilidade deste tipo tratamento para amostras com concentrações mais baixas dos compostos E2 e EE2.
- Apesar de se obterem resultados consistentes na presente dissertação, no futuro deveria ser equacionada a alteração do método analítico e de deteção, de forma a atingir limites de deteção e quantificação menores. Uma vez que os limites de deteção máximos legislados para cada um destes compostos se encontram em ng/L, para amostras reais, um método analítico viável seria a cromatografia gasosa acoplada a detetor de massa (GC-MS). No procedimento experimental a única alteração seria a introdução de uma etapa de derivação após a extração, tornando a amostra mais apta para este tipo de equipamento. Na literatura, *Iparraguirre et al.*(2011) utilizou o método de extração SBSE (com derivação após extração) e o método analítico GC e de deteção de massa para avaliar os compostos E2 e EE2, obtendo valores de limite de deteção de 16 ng/L e 7 ng/L, respetivamente. Com este método seria possível avaliar não só o E2 e EE2 bem como outros compostos disruptores endócrinos a concentrações mais baixas.
- Finalmente, avaliar a aplicabilidade do método em amostras de água residual reais.

11. Bibliografia

- AccuWeather. (2016). Lisboa, Portugal Meteorologia. Retrieved October 30, 2016, from <http://www.accuweather.com/pt/pt/lisbon/274087/july-weather/274087?monyr=7/1/2016>
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., ... Vickery, L. E. (1993). **Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2), 147–153.
- Alda, M. J. L. de, & Barceló, D. (2001). **Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters.** *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, (371), 437–447.
- Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2006). **Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1303–1311.
- American Chemical Society. (2016). CAS, Chemical Abstracts Service. Retrieved September 23, 2016, from <http://www.cas.org/>
- American Water Works Association. (1992). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** (A. E. Greenberg, L. S. Clescerl, & A. D. Eaton, Eds.) (18th ed.).
- Amorim, C. L., Duque, A. F., Afonso, C. M. M., & Castro, P. M. L. (2013). **Bioaugmentation for treating transient 4-fluorocinnamic acid shock loads in a rotating biological contactor.** *Bioresource Technology*, 144, 554–562.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B., & Ternes, T. A. (2003). **Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant.** *Environmental Science & Technology*, 37(18), 4021–4026.
- Arcand-Holy, L. D., Nimrod, a. C., & Benson, W. H. (1998). **Endocrine-modulating substances in the environment: Estrogenic effects of pharmaceutical products.** *International Journal of Toxicology*, 17(2), 139–158.
- Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., & Praveena, S. M. (2014). **Occurrence of 17- α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review.** *Environment International*, 69, 104–119.
- Assembleia da República. (2005). **Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro.** *Diário Da República: I Série*, 249, 7280–7310.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., Adams, C. D., & Surampalli, R. Y. (2006). **Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge.** *Process Biochemistry*, 41(3), 525–539.

- Balest, L., Lopez, A., Mascolo, G., & Di Iaconi, C. (2008). **Removal of endocrine disrupter compounds from municipal wastewater using an aerobic granular biomass reactor.** *Biochemical Engineering Journal*, 41(3), 288–294.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). **Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles.** *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737–747.
- Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2016). **Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495.** *Water Research*, 94, 257–279.
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., & Samperi, R. (2000). **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water.** *Environmental Science and Technology*, 34(24), 5059–5066.
- Barreiros, L., Queiroz, J. F., Magalhães, L. M., Silva, A. M. T., & Segundo, M. A. (2016). **Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review.** *Microchemical Journal*, 126, 243–262.
- Bell, A. M. (2004). **An endocrine disrupter increases growth and risky behavior in threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*).** *Hormones and Behavior*, 45(2), 108–114.
- Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., & Zoeller, R. T. (2012). **State of the science of endocrine disrupting chemicals.** In Å. Bergman, J. Heindel, S. Jobling, K. Kidd, & R. T. Zoeller (Eds.), *Toxicology Letters* (Vol. 211, p. S3).
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências.** *Química Nova*, 30(3), 651–666.
- Birkett, J. W. (2003). **Scope of the Problem.** In J. W. Birkett & J. N. Lester (Eds.), *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. (pp. 1–34). Florida: Lewis Publishers.
- Blaber, S. J. M. (1970). **The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella Lapillus* (L.).** *Journal of Molluscan Studies*, 39(2–3), 231–233.
- Briciu, R. D., Kot-wasik, A., & Namiesnik, J. (2009). **Analytical Challenges and Recent Advances in the Determination of Estrogens in Water Environments.** *Journal of Chromatographic Science*, 47, 127–139.

- Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J., & Flammarion, P. (2004). **Impacts of 17-beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*).** *Aquatic Toxicology*, 68(3), 193–217.
- Burkholder, J., Libra, B., Weyer, P., Heathcote, S., Kolpin, D., Thorne, P. S., & Wichman, M. (2007). **Impacts of waste from concentrated animal feeding operations on water quality.** *Environmental Health Perspectives*, 115(2), 308–312.
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., & Kroiss, H. (2005). **The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants.** *Water Research*, 39(1), 97–106.
- Coleman, H. M., Eggins, B. R., Byrne, J. A., Palmer, F. L., & King, E. (2000). **Photocatalytic degradation of 17-beta-oestradiol on immobilised TiO₂.** *Applied Catalysis B: Environmental*, 24(1), 3–7.
- Combalbert, S., & Hernandez-Raquet, G. (2010). **Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1671–1692.
- Danielsson, L., & Zhang, Y. (1996). **Methods for determining n-octanol-water partition constants.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(4), 188–196.
- De Coster, S., & Van Larebeke, N. (2012). **Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action.** *Journal of Environmental and Public Health*, 2012.
- De Rudder, J., Van De Wiele, T., Dhooge, W., Comhaire, F., & Verstraete, W. (2004). **Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17-alpha-ethynylestradiol (EE2).** *Water Research*, 38(1), 184–192.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Gore, A. C. (2009). **Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement.** *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.
- Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de D. (2008). **Normas de qualidade ambiental no domínio da política da água.** *Journal Oficial Da União Europeia*, (348), 84–97.
- Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro. (2000). **Quadro de acção comunitária no domínio da política da água.** *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (327), 1–72.

- Domingos, I. J. (1999). ***Contribuição para o Estudo da Biodegradação Aeróbia de Ácido Abiótico e Terpeneol***. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologias, Dissertação para obtenção do Grau de Doutor.
- Duque, A. F., Bessa, V. S., Carvalho, M. F., & Castro, P. M. L. (2011). **Bioaugmentation of a rotating biological contactor for degradation of 2-fluorophenol**. *Bioresource Technology*, 102(19), 9300–9303.
- Dutta, S., Hoffmann, E., & Hahn, H. H. (2007). **Study of rotating biological contactor performance in wastewater treatment using multi-culture biofilm model**. *Water Science and Technology*, 55((8-9)), 345–353.
- Esperanza, M., Suidan, M. T., Marfil-Vega, R., Gonzalez, C., Sorial, G. A., McCauley, P., & Brenner, R. (2007). **Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment**. *Chemosphere*, 66, 1535–1544.
- Esperanza, M., Suidan, M. T., Nishimura, F., Wang, Z. M., Sorial, G. A., Zaffiro, A., Sayles, G. (2004). **Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants**. *Environmental Science and Technology*, 38(11), 3028–3035.
- Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). **Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment**. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991–1007.
- Feng, L., Wu, Z., & Yu, X. (2013). **Quorum sensing in water and wastewater treatment biofilms**. *Journal of Environmental Biology*, 34, 437–444.
- Fernandes, S. V. F. (2016). ***Contribuição para o Estudo da Remoção Biológica de 17β-estradiol em Águas Residuais***. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologias, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia.
- Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Tyler, C. R. (2000). **Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*)**. *Ecotoxicology*, 9(1–2), 127–135.
- Folmar, L. C., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K., & Denslow, N. D. (2000). **Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay**. *Aquatic Toxicology*, 49(1–2), 77–88.
- Gałuszka, A., Migaszkowski, Z., & Namieśnik, J. (2013). **The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices**. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78–84.

- Glaze, W. H., Kang, J.-W., & Chapin, D. H. (1987). **The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation.** *Ozone: Science & Engineering.*
- Gomes, R. L., Deacon, H. E., Lai, K. M., Birkett, J. W., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2004). **An Assessment of the Bioaccumulation of Estrone in *Daphnia Magna*.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(1), 105–108.
- Görög, S. (2011). **Advances in the analysis of steroid hormone drugs in pharmaceuticals and environmental samples (2004-2010).** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 728–743.
- Haandel, A. C. van, & Lettinga, G. (1994). **Anaerobic Sewage Treatment- A Practical Guide for Regions with a Hot Climate.** WILEY.
- Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012). **Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix.** *Water Research*, 46(18), 5813–5833.
- Hanselman, T. A., Graetz, D. A., & Wilkie, A. C. (2003). **Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review.** *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5471–5478.
- Harris, H. A., Albert, L. M., Leathurby, Y., Malamas, M. S., Mewshaw, R. E., Miller, C. P., Keith, J. C. (2003). **Evaluation of an estrogen receptor- β agonist in animal models of human disease.** *Endocrinology*, 144(10), 4241–4249.
- Hassard, F., Biddle, J., Cartmell, E., Jefferson, B., Tyrrel, S., & Stephenson, T. (2015). **Rotating biological contactors for wastewater treatment - A review.** *Process Safety and Environmental Protection*, 94(C), 285–306.
- Hill, R. L., & Janz, D. M. (2003). **Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success.** *Aquatic Toxicology*, 63(4), 417–429.
- Hintemann, T., Schneider, C., Schöler, H. F., & Schneider, R. J. (2006). **Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment.** *Water Research*, 40(12), 2287–2294.
- Hiras, D. N., Manariotis, I. D., & Grigoropoulos, S. G. (2004). **Organic and nitrogen removal in a two-stage rotating biological contactor treating municipal wastewater.** *Bioresource Technology*, 93(1), 91–98.
- Hoeck, E. Van. (2009). **Development of multi-residue and selective methods for the ultra-sensitive determination of endocrine disrupting chemicals in aqueous samples.** Universiteit Gent, Faculteit Wetenschappen, Thesis submitted to the Faculty of Science in

fulfilment of the requirements to obtain the degree of Doctor in Sciences, Chemistry.

- Hogan, N. S., Lean, D. R. S., & Trudeau, V. L. (2006). **Exposures to estradiol, ethinylestradiol and octylphenol affect survival and growth of *Rana pipiens* and *Rana sylvatica* tadpoles.** *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 69(16), 1555–1569.
- Hu, J., Cheng, S., Aizawa, T., Terao, Y., & Kunikane, S. (2003). **Products of Aqueous Chlorination of 17-beta-Estradiol and Their Estrogenic Activities.** *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5665–5670.
- Huang, X., Yuan, D., & Huang, B. (2008). **Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection.** *Talanta*, 75(1), 172–177.
- Huber, M. M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C. S., Von Gunten, U. (2005). **Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study.** *Environmental Science and Technology*, 39(11), 4290–4299.
- Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H., & Tyler, C. R. (2006). **Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment.** *Environmental Health Perspectives*, 114(SUPPL.1), 106–114.
- Ibrahim, H. T., Qiang, H., Al-Rekabi, W. S., & Qiqi, Y. (2012). **Improvements in biofilm processes for wastewater treatment.** *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(8), 610–636.
- Ifelebuegu, O. (2011). **The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes.** *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(2), 245–254.
- Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J., & Roubin, M. De. (2003). **Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography – tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, 1020, 99–104.
- International Organization for Standardization. ISO 6060. **Water quality-Determination of the chemical oxygen demand** (1989).
- Iparraguirre, A., Prieto, A., Navarro, P., Olivares, M., Fernández, L.-Á., & Zuloaga, O. (2011). **Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation – thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (401), 339–352.
- Jeswani, H., & Mukherji, S. (2012). **Degradation of phenolics, nitrogen-heterocyclics and polynuclear aromatic hydrocarbons in a rotating biological contactor.** *Bioresource Technology*, 111, 12–20.

- Jiang, J. Q., Yin, Q., Zhou, J. L., & Pearce, P. (2005). **Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters.** *Chemosphere*, 61(4), 544–550.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. a, Matthiessen, P., & Sumpter, J. P. (2009). **Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2), 194–202.
- Johnson, A. C., Belfroid, A., & Di Corcia, A. (2000). **Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.** *Science of the Total Environment*, 256(2–3), 163–173.
- Johnson, A. C., & Williams, R. J. (2004). **A Model To Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol Sewage Treatment Works.** *Environmental Science & Technology*, 38, 3649–3658.
- Johnson, A. C., Williams, R. J., & Matthiessen, P. (2006). **The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study.** *Science of the Total Environment*, 362(1–3), 166–178.
- Jordan, S. J., Benson, W. H., Foran, C. M., Bennett, E. R., & Snyder, E. M. (2010). **Endocrine-Disrupting Compounds in Aquatic Ecosystems.** In J. C. Eldridge & J. T. Stevens (Eds.), *Endocrine Toxicology* (3rd ed., p. 424). Florida: Informa.
- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P. R., & Siegrist, H. (2004). **Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization.** *Environmental Science and Technology*, 38(11), 3047–3055.
- Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Honjo, T. (2002). **Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*).** *Chemosphere*, 47, 71–80.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). **Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity.** *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4693–8.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2009). **The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters.** *Water Research*, 43(2), 363–380.
- Kim, H. sang, Yamada, H., & Tsuno, H. (2007). **The removal of estrogenic activity and control of brominated by-products during ozonation of secondary effluents.** *Water Research*, 41(7), 1441–1446.

- Kim, S.-H., Tian, Q., Fang, J., & Sung, S. (2015). **Removal of 17- β estradiol in water by sonolysis.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 11–14.
- Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2008). **Treatment and Removal Strategies for Estrogens From Wastewater.** *Environmental Technology*, 29(3), 245–267.
- Kolodziej, E. P., Harter, T., & Sedlak, D. L. (2004). **Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment.** *Environmental Science and Technology*, 38(23), 6377–6384.
- Kozłowska-Tylingo, K., Namieśnik, J., & Górecki, T. (2016). **Critical Reviews in Analytical Chemistry Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples — A Review of Chromatographic Methods Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples — A Review of Chromatography.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (40), 194–201.
- Kurecková, K., Maralíková, B., & Ventura, K. (2002). **Supercritical fluid extraction of steroids from biological samples and first experience with solid-phase microextraction – liquid chromatography.** *Journal of Chromatography B*, 770, 83–89.
- L.R. Iwanowicz, V.S. Blazer, C.P. Guy, A.E. Pinkney, J.E. Mullican, D. A. A. (2009). **Reproductive health of bass in the Potomac, U.S.A., drainage: part 1. Exploring the effects of proximity to wastewater treatment plant discharge.** *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 28(5), 1072–1083.
- Lai, K. M., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2002). **Biotransformation and Bioconcentration of Steroid Estrogens by *Chlorella vulgaris*** *Biotransformation and Bioconcentration of Steroid Estrogens by *Chlorella vulgaris*.* *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 859–864.
- Langford, K. H., & Lester, J. N. (2003). **Fate and Behavior of Endocrine Disrupters in Wastewater treatment Processes.** In J. W. Birkett & J. N. Lester (Eds.), *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. (pp. 103–143). Florida: Lewis Publishers.
- Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P. E., & Förlin, L. (1999). **Ethinylestradiol - An undesired fish contraceptive?** *Aquatic Toxicology*, 45(2–3), 91–97. [http://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00112-X](http://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00112-X)
- Lazarova, V., & Manem, J. (1995). **Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment.** *Water Research*, 29(10), 2227–2245.
- Lee, Y., & Von Gunten, U. (2009). **Transformation of 17 β -ethinylestradiol during water chlorination: Effects of bromide on kinetics, products, and transformation pathways.** *Environmental Science and Technology*, 43(2), 480–487.

- Lewis, K. (2005). **Persister cells and the riddle of biofilm survival.** *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 267–274.
- Liney, K. E., Hagger, J. A., Tyler, C. R., Depledge, M. H., Galloway, T. S., & Jobling, S. (2006). **Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works.** *Environmental Health Perspectives*, 114(SUPPL.1), 81–89.
- Liu, Z. hua, Kanjo, Y., & Mizutani, S. (2009). **Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review.** *Science of the Total Environment*, 407(2), 731–748.
- Liu, Z., Lu, G., Yin, H., Dang, Z., Littier, H., & Liu, Y. (2015a). **Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 64, 149–164.
- Liu, Z., Lu, G., Yin, H., Dang, Z., Littier, H., & Liu, Y. (2015b). **Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 64, 149–164.
- Lloret, L., Eibes, G., Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2013). **Removal of estrogenic compounds from filtered secondary wastewater effluent in a continuous enzymatic membrane reactor. Identification of biotransformation products.** *Environmental Science and Technology*, 47(9), 4536–4543.
- Lorenzen, A., Hendel, J. G., Conn, K. L., Bittman, S., Kwabiah, A. B., Lazarovitz, G., Topp, E. (2004). **Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures.** *Environmental Toxicology*, 19(3), 216–225.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Wang, X. C. (2014). **A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment.** *Science of the Total Environment*, 473–474, 619–641.
- Matthiessen, P., Arnold, D., Johnson, A. C., Pepper, T. J., Pottinger, T. G., & Pulman, K. G. T. (2006). **Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms.** *Science of the Total Environment*, 367(2–3), 616–630.
- Metcalfe, C. D., Metcalfe, T. L., Kiparissis, Y., Koenig, B. G., Khan, C., Hughes, R. J., Potter, T. (2001). **Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*).** *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(2), 297–308.
- Ministério do Ambiente. (1997). Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de Junho de 1997. *Diário Da República - 1 Série-A*, Nº 139, 2959–2967.

- Moharikar, A., Purohit, H. J., & Kumar, R. (2005). **Microbial population dynamics at effluent treatment plants.** *National Environmental Engineering Research Institute*, (7), 552–558.
- Morasch, B., Bonvin, F., Reiser, H., Grandjean, D., De Alencastro, L. F., Perazzolo, C., Kohn, T. (2010). **Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: Micropollutant removal between wastewater and raw drinking water.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1658–1668.
- Moreira, F. C., Soler, J., Alpendurada, M. F., Boaventura, R. A. R., Brillas, E., & Vilar, V. J. P. (2016). **Tertiary treatment of a municipal wastewater toward pharmaceuticals removal by chemical and electrochemical advanced oxidation processes.** *Water Research*, 105, 251–263.
- Moriyama, K., Matsufuji, H., Chino, M., & Takeda, M. (2004). **Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol.** *Chemosphere*, 55(6), 839–847.
- Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Tyler, C. R. (2004). **Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish.** *Environmental Health Perspectives*, 112(17), 1725–1733.
- National Cancer Institute. (2016). **Ethinyl Estradiol** (Code C486). Retrieved September 26, 2016, from http://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C486
- National Center for Biotechnology Information. (2016a). **Estradiol**. Retrieved September 23, 2016, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757>
- National Center for Biotechnology Information. (2016b). **Ethinyl Estradiol**. Retrieved September 26, 2016, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5991>
- Nogueira, J. M. F. (2012). **Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática.** *Scientia Chromatographica*, 4(4), 259–269.
- Novotný, Č., Trošt, N., Šušla, M., Svobodová, K., Mikesková, H., Válková, H., Pavko, A. (2012). **The use of the fungus *Dichomitus squalens* for degradation in rotating biological contactor conditions.** *Bioresource Technology*, 114, 241–246.
- Ohko, Y., Iuchi, K. I., Niwa, C., Tatsuma, T., Nakashima, T., Iguchi, T., Fujishima, A. (2002). **17-beta-estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity.** *Environmental Science and Technology*, 36(19), 4175–4181.

- Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. A. (2011). **Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review.** *Science of the Total Environment*, 409(20), 4141–4166.
- Orandi, S., Lewis, D. M., & Moheimani, N. R. (2012). **Biofilm establishment and heavy metal removal capacity of an indigenous mining algal-microbial consortium in a photo-rotating biological contactor.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(9), 1321–1331.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2013). **Diretiva 2013/39/UE de 12 de Agosto que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água.** *Jornal Oficial Da União Europeia*, (226), 1–17.
- Parlamento Europeu e do Conselho, D. n. . 2455/2001/CE de 20 de N. (2001). **Lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE.** *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (331), 1–5.
- Patwardhan, A. W. (2003). **Rotating Biological Contactors: A Review.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(10), 2035–2051.
- Pereira, V. J., Galinha, J., Barreto Crespo, M. T., Matos, C. T., & Crespo, J. G. (2012). **Integration of nanofiltration, UV photolysis, and advanced oxidation processes for the removal of hormones from surface water sources.** *Separation and Purification Technology*, 95, 89–96.
- Pérez, R. L., & Escandar, G. M. (2014). **Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters.** *Analytica Chimica Acta*, 835, 19–28.
- Pessoa, G. P., de Souza, N. C., Vidal, C. B., Alves, J. A. C., Firmino, P. I. M., Nascimento, R. F., & dos Santos, A. B. (2014). **Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants.** *Science of the Total Environment*, 490, 288–295.
- Pickering, A. D., & Sumpter, J. P. (2003). **Comprehending endocrine disruptors in aquatic environments.** *Environmental Science & Technology*, 37(17), 331A–336A.
- Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodríguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., & Cela, R. (2004). **Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection.** *Journal of Chromatography A*, 1024, 177–185.
- Rangel, J. F. P. G. de F. (2010). **Análise quantitativa de monómeros existentes na saliva através de técnicas cromatográficas.** Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Dentária.

- Rodrigues, R. M. (2009). **Contribuição para o Estudo de Biofilmes de Espessura Controlada - Idade do Biofilme**. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Sanitária.
- Rogers, H. R. (1996). **Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges**. *Science of the Total Environment*, 185(1–3), 3–26.
- Rolim, M. F. (2014). **Contribuição para o estudo da caracterização de biofilmes de diferentes idades**. Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia Sanitária.
- Rosa, R. M. R. (2008). **Contribuição para o estudo de compostos desreguladores endócrinos(EDC) em ETAR: Estudo da remoção de EDC'S numa ETAR com tratamento terciário**. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia Sanitária.
- Rutishauser, B. V., Pesonen, M., Escher, B. I., Ackermann, G. E., Aerni, H.-R., Suter, M. J.-F., & Eggen, R. I. L. (2004). **Comparative Analysis of Estrogenic Activity in Sewage Treatment Plant Effluents Involving Three in Vitro Assays and Chemical Analysis of Steroids**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 857–864.
- Safe, S. (2004). **Endocrine disruptors and human health: Is there a problem**. *Toxicology*, 205(1–2 SPEC. ISS.), 3–10.
- Sánchez, F. J. C., Gómez, R. R., Gómez, A. Z., Fandila, A. S., & Vílchez, J. L. (2014). **Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends**. *Talanta*, 130, 388–399.
- Sawyer, C. N., & McCarty, P. L. (1978). *Chemistry for Environmental Engineering* (3rd ed.). New York: McGraw-Hill Publishing.
- Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Ternes, T. A. (2005). **Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants**. *Science of the Total Environment*, 336(1–3), 155–170.
- Shappell, N. W., Vrabel, M. A., Madsen, P. J., Harrington, G., Billey, L. O., Hakk, H., Collins, T. J. (2008). **Destruction of estrogens using Fe-TAML/peroxide catalysis**. *Environmental Science and Technology*, 42(4), 1296–1300.
- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., & Hosomi, M. (2004). **Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea***. *Water Research*, 38(9), 2322–2329.

- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). **Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods.** *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21.
- Simonich, S. L., Federle, T. W., Eckhoff, W. S., Rottiers, A., Webb, S., Sabaliunas, D., & De Wolf, W. (2002). **Removal of fragrance materials during U.S. and European wastewater treatment.** *Environmental Science and Technology*, 36(13), 2839–2847.
- Sirianuntapiboon, S., & Chumlaong, S. (2013). **Effect of Ni²⁺ and Pb²⁺ on the efficiency of packed cage rotating biological contactor system.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3), 233–240.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., & Main, K. M. (2001). **Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects.** *Human Reproduction*, 16(5), 972–978.
- Smith, B. S. (1971). **Sexuality in the American mud snail, *Nassarius Obsoletus* Say.** *Journal of Molluscan Studies*, 39(5), 377–378.
- Soeiro, C. R. P. (2009). **Estudo do Tratamento Biológico seguido de Fotólise para Remoção de Xenobióticos de águas Residuais.** Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias.
- Sousa, M. A. D. de. (2013). **Analysis of pharmaceutical residues in wastewaters, surface and drinking waters - Study of the removal efficiency through conventional and advanced treatment processes.** Universidade do Porto, Tese para obtenção do Grau de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, Especialidade de Hidrologia.
- Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2013). **Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry.** *Journal of Chromatography A*, 1321, 1–13.
- Su, R., Zhang, G., Wang, P., Li, S., Ravenelle, R. M., & Crittenden, J. C. (2015). **Treatment of Antibiotic Pharmaceutical Wastewater Using a Rotating Biological Contactor.** *Journal of Chemistry*.
- Suri, R. P. S., Nayak, M., Devaiah, U., & Helmig, E. (2007). **Ultrasound assisted destruction of estrogen hormones in aqueous solution: Effect of power density, power intensity and reactor configuration.** *Journal of Hazardous Materials*, 146(3), 472–478.
- Suri, R. P. S., Singh, T. S., & Abburi, S. (2010). **Influence of alkalinity and salinity on the sonochemical degradation of estrogen hormones in aqueous solution.** *Environmental Science and Technology*, 44(4), 1373–1379.
- Tawfik, A., Klapwijk, A., El-Gohary, F., & Lettinga, G. (2005). **Potentials of using a rotating biological contactor (RBC) for post-treatment of anaerobically pre-treated domestic**

- wastewater.** *Biochemical Engineering Journal*, 25(1), 89–98.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (2003). **Attached Growth and Combined Biological Treatment Processes.** In Metcalf & Eddy (Ed.), *Wastewater Engineering Treatment and Reuse* (4th ed., pp. 887–969). McGraw-Hill Publishing.
- Teixeira, P., & Oliveira, R. (2000). **Denitrification by *Alcaligenes denitrificans* in a closed rotating biological contactor.** *Biotechnology Letters*, 22(22), 1789–1792.
- Teske, S. S., & Arnold, R. G. (2008). **Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment.** *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(2), 107–124.
- Tienpont, B., David, F., Desmet, K., & Sandra, P. (2002). **Stir bar sorptive extraction – thermal desorption – capillary GC – MS applied to biological fluids.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (373), 46–55.
- Tomšková, H., Aufartová, J., Solich, P., Nováková, L., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2012). **High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 34, 35–58.
- Vader, J. S., Van Ginkel, C. G., Sperling, F. M. G. M., De Jong, J., De Boer, W., De Graaf, J. S., Stokman, P. G. W. (2000). **Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge.** *Chemosphere*, 41(8), 1239–1243.
- Van den Belt, K., Wester, P. W., van der Ven, L. T. M., Verheyen, R., & Witters, H. (2002). **Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility.** *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 21(4), 767–775.
- Vicente, A. C. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α - Etinilestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos.** Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia Sanitária.
- Viladomat, M. R. (2010). **Effects of priority and emerging pollutants on river biofilms.** *Biofilms*. Universitat de Girona.
- Vlamakis, H., Kolter, R., & López, D. (2010). **Biofilms.** *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, 1–12.
- Water Environment Federation. (2011). **Rotating Biological Contactors.** In WEFpress (Ed.), *Biofilm Reactors* (pp. 173–210). McGraw-Hill Publishing.
- Weber, L. P., Hill, R. L., & Janz, D. M. (2003). **Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ**

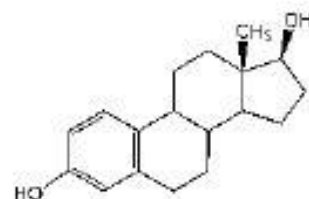
- toxicity.** *Aquatic Toxicology*, 63(4), 431–446.
- Wien, B., & Mikrobiologie, A. (1999). **17 B-Estradiol: Behavior During Waste Water Analysis.** *Chemosphere*, 39(11), 1903–1909.
- Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H., & Matsuo, T. (2004). **Effects of substrate loading rate on biofilm structure.** *Water Research*, 38(10), 2479–2488.
- Wise, A., O'Brien, K., & Woodruff, T. (2011). **Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water?** *Environmental Science and Technology*, 45(1), 51–60.
- Woods, M., & Kumar, A. (2011). **Vitellogenin induction by 17-beta-estradiol and 17-alpha-ethynylestradiol in male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*).** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2620–2627.
- Xu, N., Xu, Y. F., Xu, S., Li, J., & Tao, H. C. (2012). **Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: A Chinese perspective.** *Environmental Pollution*, 165, 215–224.
- Ying, G. G., Kookana, R. S., & Ru, Y. J. (2002). **Occurrence and fate of hormone steroids in the environment.** *Environment International*, 28(6), 545–551.
- Zillioux, E. J., Johnson, I. C., Kiparissis, Y., Metcalfe, C. D., Wheat, J. V, Ward, S. G., & Liu, H. (2001). **The sheepshead minnow as an in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17alpha-ethynylestradiol.** *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(9), 1968–1978.

Product Specification

Alfa Aesar[®]

L03801 beta-Estradiol, 99% (dry wt.), ca 3% water

Product Number: L03801
CAS number: 50-28-2
MDL number: MFCD00003693
Molecular formula: C₁₈H₂₄O₂
Molecular weight: 272.39



Product Specification

Appearance (Color): White
Form: Powder
Assay (Silylated GC): > 98.5%
Water Content (Karl Fischer Titration): <4.0%
Optical Rotation: +79.0° \pm 3.0° (c=1 in Dioxane)

Date of Print: October 30, 2016
Version: 5

Product Specifications are subject to amendment and may change over time.

Anexo II - Ficha Técnica 17 α -Ethinilestradiol

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

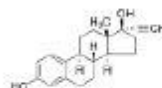
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
17 α -Ethinylestradiol - $\geq 98\%$

Product Number: E4876
CAS Number: 57-63-6
MDL: MFCD00003690
Formula: C₂₀H₂₄O₂
Formula Weight: 296.40 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	White to Off-White
Appearance (Form)	Powder
BMM	2.01 - 2.10
Lambda Max of 281 to 282 nm, in EtOH	
Wavelength	281 - 282 nm
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear
50 mg/ml, EtOH	
Purity (HPLC)	> 98 %
Specification: PRD.0.ZQ5.10000044476	

Anexo III – Tabelas Referência

Tabela III.1 Identificação das 33 substâncias/grupos de substâncias prioritárias no Domínio da Política da Águas. (Fonte: Diretiva n. 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, Anexo II).

	Nome da substância prioritária	Identificada como substância perigosa prioritária
1	Alachloro	
2	Antraceno	X
3	Atrazina	
4	Benzeno	
5	Éteres difenólicos bromados	X
6	Cádmio e compostos de cádmio	X
7	C ₁₀₋₁₃ -cloroalcenos	X
8	Clorfenvinfos	
9	Clorpirifos (Cloropirifos-etilo)	
10	1,2-Dicloroetano	
11	Diclorometano	
12	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	X
13	Diuron	
14	Endosulfan (alfa-endossulfano)	X
15	Fluoranteno	
16	Hexaclorbenzeno	X
17	Hexaclorbutadieno	X
18	Hexaclorciclohexano (isómero gama, Lindano)	X
19	Isoproturon	
20	Chumbo e composto de chumbo	
21	Mercúrio e composto de mercúrio	X
22	Naftaleno	
23	Níquel e composto de níquel	
24	Nonilfenóis (4-(para)-nonilfenol)	X X
25	Octilfenóis (para-tert-octilfenol)	
26	Pentaclorobenzeno	X
27	Pentaclorofenol	
28	Hidrocarbonetos poliaromáticos (Benzo[a]pireno) (Benzo[b]fluoranteno) (Benzo[g,h,i]perileno) (Benzo[k]fluoranteno) (Indeno[1,2,3-cd]pireno)	X X X X X
29	Simazina	
30	Composto de tributilteno (catião-tributilteno)	X X
31	Triclorobenzenos (1,2,4-Triclorobenzeno)	
32	Triclorometano (Clorofórmio)	
33	Trifluralina	X

Tabela III.2 Identificação das 12 substâncias adicionadas à lista das 33 substâncias. (Fonte: Diretiva 2013/39/EU do Parlamento Europeu e do Conselho e 12 de agosto de 2013, Anexo I).

	Nome da substância prioritária	Identificada como substância perigosa prioritária
34	Dicofol	X
35	Ácido perfluorooctanossulfónico e seus derivados (PFOS)	X
36	Quinoxifena	X
37	Dioxinas e compostos semelhantes a dioxinas	X
38	Aclonifena	
39	Bifenox	
40	Cibutrina	
41	Cipermetrina	
42	Diclorvos	
43	Hexabromociclododecanos (HBCDD)	X
44	Heptacloro e epóxido de heptacloro	X
45	Terbutrina	

Tabela III.3 Lista de vigilância das substâncias para monitorização (Fonte: Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015).

Nome da substância /grupo de substâncias	Limite de deteção máximo aceitável do método (ng/L)
17alfa-Etinilestradiol (EE2)	0,035
17beta-Estradiol (E2), Estrona (E1)	0,4
Diclofenac	10
2,6-ditert-butil-4-metilfenol	3 160
4-Metoxicinamato de 2-etil-hexilo	6 000
Antibióticos da família dos macrólidos	90
Metiocarbe	10
Neonicotinoides	9
Oxadiazão	88
Triatato	670

Anexo IV - Cromatogramas do 1º Ensaio

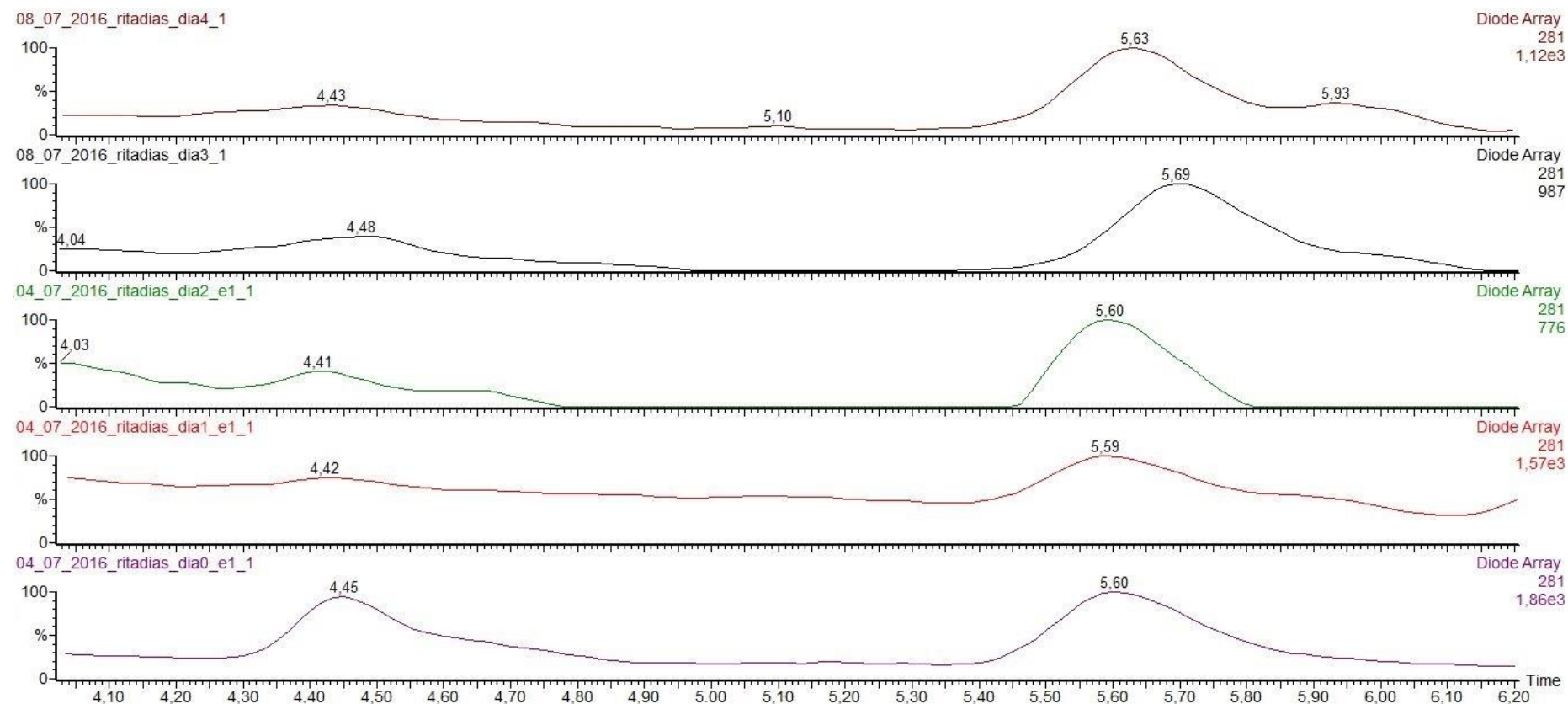


Figura IV.1 Cromatogramas correspondentes ao 1º ensaio, do dia 0 (1º de baixo) até ao dia 4 (1º de cima). Mais à esquerda encontra-se o pico correspondente ao composto E2, no tempo 4,4 minutos e à direita encontra-se o pico correspondente ao composto EE2, no tempo de retenção 5,6 minutos ($\lambda=281$ nm).

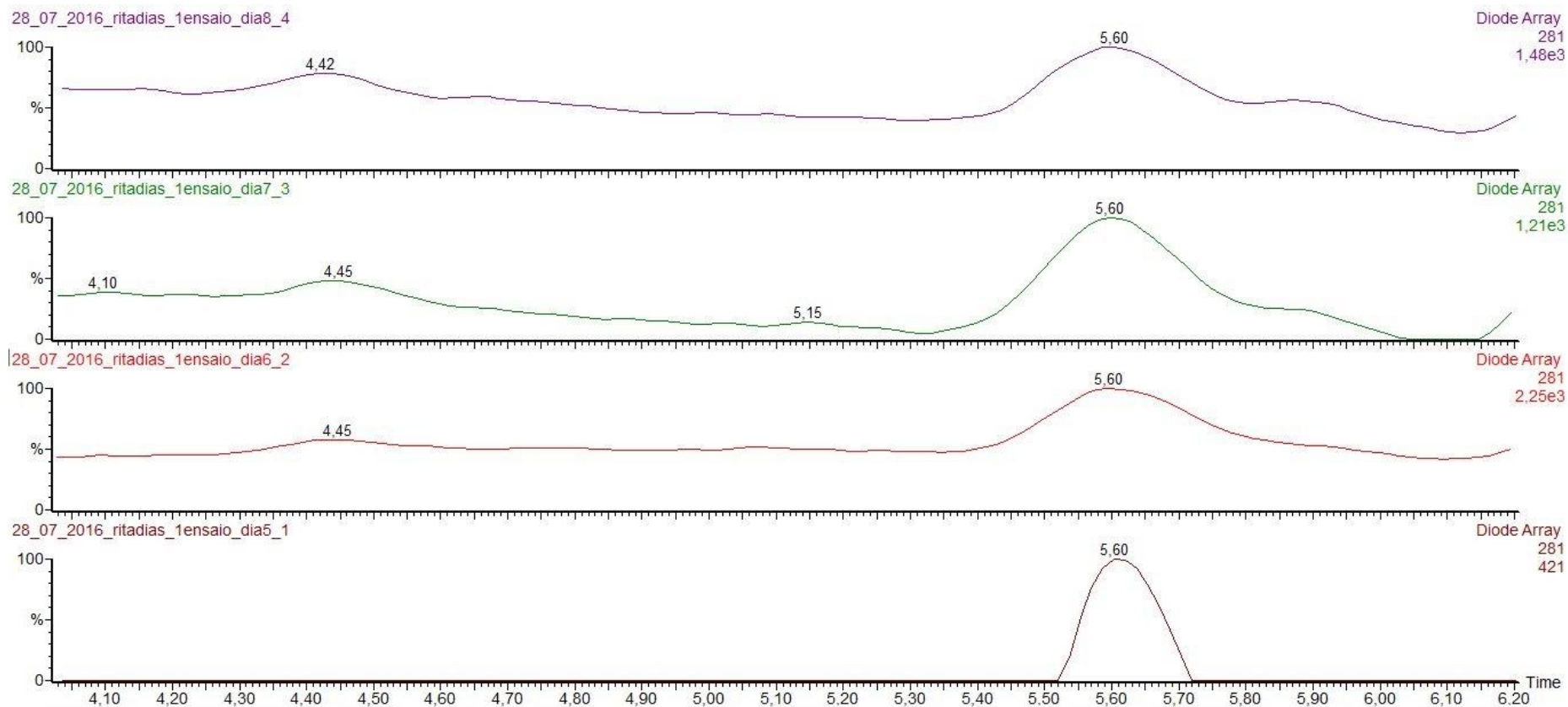


Figura IV.2 Cromatogramas correspondentes ao 1º ensaio, do dia 5 (1º de baixo) até ao dia 8 (1º de cima). Mais à esquerda encontra-se o pico correspondente ao composto E2, no tempo 4,4 minutos e à direita encontra-se o pico correspondente ao composto EE2, no tempo de retenção 5,6 minutos ($\lambda=281$ nm).

Anexo V - Cromatogramas do 2º Ensaio

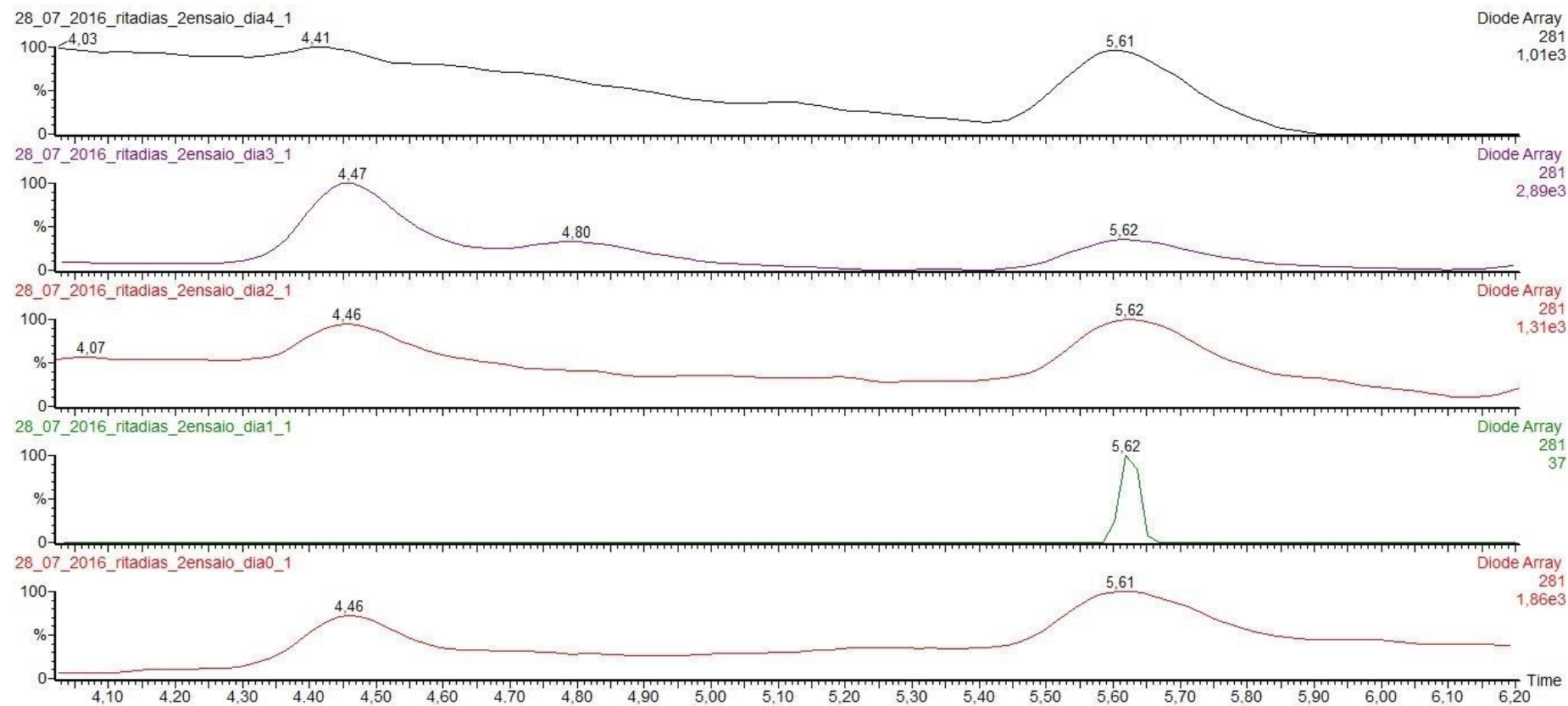


Figura V.1 Cromatogramas correspondentes ao 2º ensaio, do dia 0 (1º de baixo) até ao dia 4 (1º de cima). Mais à esquerda encontra-se o pico correspondente ao composto E2, no tempo 4,4 minutos e à direita encontra-se o pico correspondente ao composto EE2, no tempo de retenção 5,6 minutos ($\lambda=281$ nm).

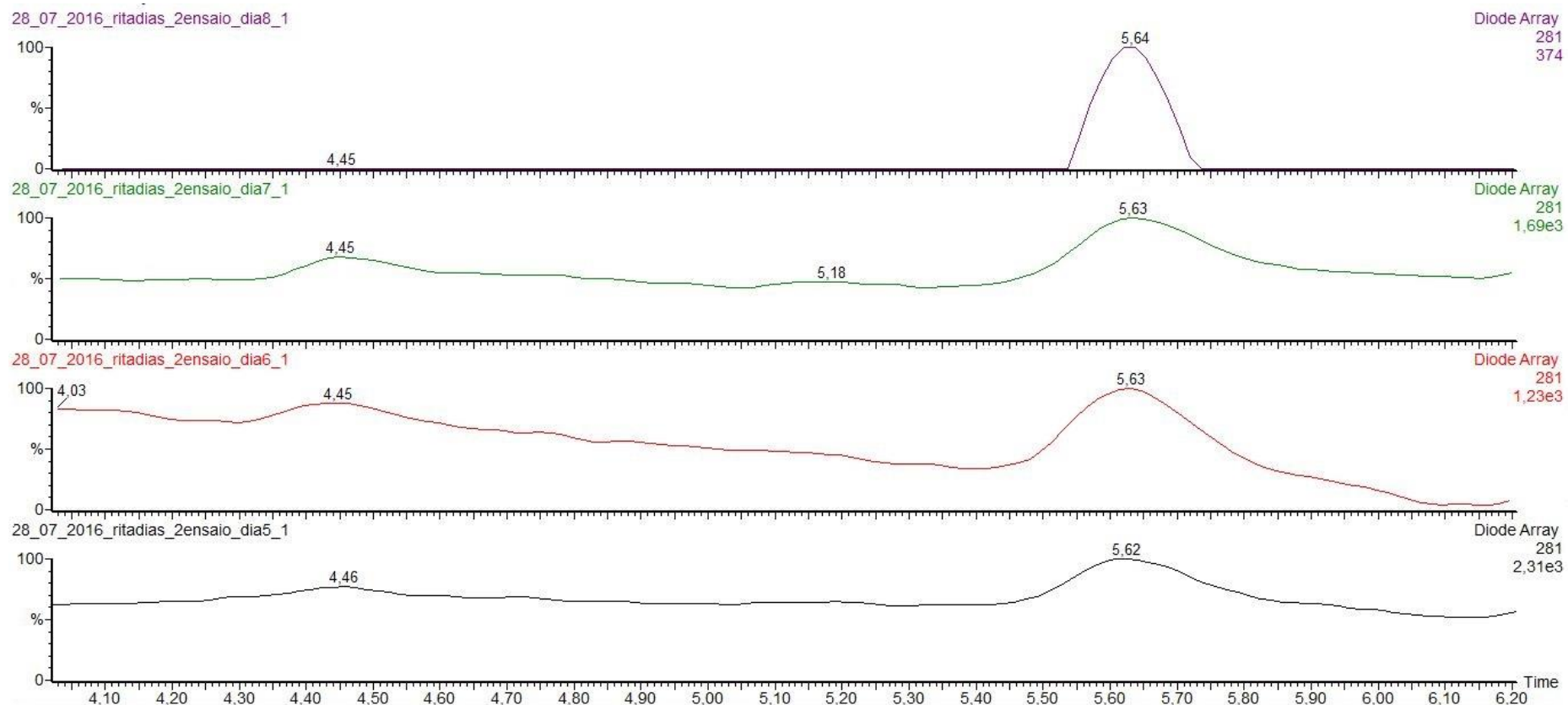


Figura V.2 Cromatogramas correspondentes ao 2º ensaio, do dia 5 (1º de baixo) até ao dia 8 (1º de cima). Mais à esquerda encontra-se o pico correspondente ao composto E2, no tempo 4,4 minutos e à direita encontra-se o pico correspondente ao composto EE2, no tempo de retenção 5,6 minutos ($\lambda=281$ nm).

